

Universidad Carlos III de Madrid

Grado en Ingeniería Mecánica



Trabajo Fin de Grado

**MATERIALES NANOCUMPUSTOS BASADOS EN
LDPE RELLENO CON NANOTUBOS DE CARBONO;
CON POTENCIALES PROPIEDADES BACTERICIDAS.**

Autora: Erika Benigno Escribano

Tutor: Francisco Javier González Benito

Octubre 2015

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar, me gustaría agradecer al Dr. Javier González Benito que me haya brindado la oportunidad de realizar mi trabajo fin de grado en esta línea de investigación, y de que haya sido mi tutor, guiándome en mi aprendizaje. También me gustaría mostrar mi agradecimiento al departamento en general de Ciencia e ingeniería de Materiales e Ingeniería Química.

Quiero agradecer, el apoyo y la colaboración por parte de Angélica Corral, Gustavo González, Freddy Ariel y demás compañeros del departamento y también a la Universidad Carlos III de Madrid que ha permitido que haya realizado este trabajo y me ha formado desde el primer año en muchos aspectos de mi vida.

A todos mis amigos que han estado a mi lado, compartiendo tanto los buenos momentos como los malos durante toda mi carrera, y me han apoyado siempre, lo cuál ha sido fundamental para llegar aquí. Especialmente a Gonzalo, Marta y Pablo.

Y por último, quiero agradecer a mis padres, todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de todos estos años, escuchándome, animándome y sacándome una sonrisa cuando más lo he necesitado. Muchas gracias por haber confiado siempre en mí y por hacerme ver en los momentos más duros que era capaz de conseguirlo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Objetivos.	17
1.1.1 General	18
1.1.2 Específicos	18
2. FUNDAMENTOS.....	19
2.1 Materiales compuestos	19
2.2 Materiales antibacterianos	21
2.3 Materiales nanocompuestos antibacterianos	22
2.4 Polietileno de baja densidad (LDPE)	23
2.5 Nanopartículas de nanotubos de carbono	24
3. PARTE EXPERIMENTAL.	27
3.1 Materiales.	27
3.1.1 Polietileno de baja densidad (LDPE)	27
3.1.2 Nanotubos de carbono (CNT)	27
3.2 Preparación de muestras	27
3.2.1 Composición	27
3.2.2 Preparación de films	28
3.2.2.1 Trituración	28
3.2.2.2 Molienda	30
3.2.2.3 Prensado en caliente	32
3.3 Técnicas y métodos experimentales	35
3.3.1 Ensayo de tracción	35
3.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	39
3.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	43
3.3.4 Energía superficial y ángulo de contacto	43
3.3.5 Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	47
3.3.6 Análisis bacteriológico	48
3.3.6.1 Procedimiento de elaboración de biofilms	48
3.3.6.2 Ensayo de cultivo	60
3.3.6.3 Análisis de imagen por microscopía	64
3.3.7 SEM	64
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
4.1 Ensayo de tracción.	68

4.2	Calorimetría diferencia por barrido (DSC).	78
4.3	Análisis termogravimétrico (TGA).	83
4.4	Energía superficial y ángulo de contacto.	86
4.4.1	Determinación de la mojabilidad.	86
4.5	Espectrometría Infrarroja (FTIR).	91
4.6	Análisis bacteriológico.	93
4.7	Microscopio electrónico de barrido (SEM).	97
5.	CONCLUSIONES.	102
6.	TRABAJOS FUTUROS.	104
7.	PRESUPUESTO.	105
7.1	Presupuesto para ensayo de cultivo.	105
7.2	Presupuesto de los materiales empleados.	107
7.3	Presupuesto de equipos utilizados	108
7.4	Presupuesto del trabajo de análisis de ingeniero junior.	110
7.5	Presupuesto total del trabajo de investigación.	111
8.	REFERENCIAS.	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Porcentaje de fabricación y utilización de los plásticos más convencionales. [2].....	15
Figura 2.- Demanda de plásticos en función del sector industrial.[3].....	15
Figura 3.- Distribución de materiales de embalaje en función de su destino final. [4].....	16
Figura 4.- Estructura unidad que se repite para formar polietileno.	23
Figura 5.- Esquema representativo de una cadena de polietileno de alta densidad HDPE a) y de otra de baja densidad b).	24
Figura 6.- Nanotubos de carbono de pared simple (izq.) y de pared múltiple (dcha.).....	25
Figura 7.- Molino MF 10 Basic Microfine, para trituración.	29
Figura 8.- Escamas de LDPE obtenidas tras el proceso de trituración.	30
Figura 9.- Molino mezclador MM400 marca RESTCH para la molienda criogénica.	30
Figura 10.- Polvos obtenidos tras el proceso de HEBM: Izq.) Aspecto LDPE + 1% en peso de nanotubos de carbono molido Dcha.) Aspecto del LDPE molido (dcha.).	31
Figura 11.- Aspecto final de placas de aluminio para prensado, después de colocar la máscara de Kapton.	32
Figura 12.- Placa de aluminio recubierta de Kapton con polímero preparado para el prensado.	33
Figura 13.- Primeras condiciones de presión-temperatura-tiempo en la prensa de platos calientes para la obtención de los films.	33
Figura 14.- Condiciones finales utilizadas de presión-temperatura-tiempo en la prensa de platos caliente para la obtención de los films.	34
Figura 15.- Aspecto de un film de LDPE después del correspondiente proceso de prensado en caliente.	35
Figura 16.- Máquina universal de ensayos Shimadzu Autograp utilizada en la realización de los ensayos de tracción.....	36
Figura 17.- Dimensiones probeta para ensayo a tracción según norma ISO 3167:2002.	36
Figura 18.- Imagen de probetas de los distintos materiales preparados.....	37
Figura 19.- Puntos de las probetas donde, de manera aproximada, se realizaron las mediciones de espesor y ancho.....	38
Figura 20.- Probeta en las mordazas de la máquina de tracción.	39
Figura 21.- Calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo 822e.....	40
Figura 22.- Cápsula de aluminio que se utiliza para realizar el DSC.	41
Figura 23.- Termograma típico de un polímero semicristalino obtenido por DSC.....	42

Figura 24.- Esquema representativo de la medida del ángulo de contacto.....	44
Figura 25.- Ajuste lineal asociado a la aplicación del método OWRK.	46
Figura 26.- Probetas preparadas para la realización de los biofilms.....	48
Figura 27.- Limpieza con etanol de las probetas.....	49
Figura 28.- Esquema primer procedimiento.	51
Figura 29.- Pipeteado de las bacterias sobre los materiales.	52
Figura 30.- Bacterias incubando sobre los materiales.	53
Figura 31.- Aspiración del sobrenadante de bacterias.....	53
Figura 32.- Prueba de cultivo con las diferentes diluciones.....	55
Figura 33.- Esquema segundo procedimiento.	56
Figura 34.- Esquema tercer procedimiento.....	59
Figura 35.- Arrastre de las bacterias con la torunda.	61
Figura 36.- Torunda impregnada de bacterias en tubo de falcom.	61
Figura 37.- Esquema de la distribución de las diluciones en la placa de agar en el 2º procedimiento.....	62
Figura 38.- Resultados del cultivo en el segundo procedimiento A) LDPE Triturado B) LDPE Triturado + Molido	63
Figura 39.- Esquema de la distribución de las diluciones en la placa agar en el 3 ^{er} procedimiento de cultivo.....	64
Figura 40.- Microscopio electrónico de barrido Philips XL30	65
Figura 41.- Máquina de deposición anódica para el recubrimiento de las probetas.....	66
Figura 42.- Gráfica de tensión-deformación con los parámetros importantes.....	68
Figura 43.- a) Dos laminillas de cadenas plegadas contiguas y el material amorfo interlaminar antes de la deformación; b) alargamiento de las cadenas del material amorfo durante la primera etapa de la deformación; c) inclinación de las laminillas en la dirección del esfuerzo durante la segunda etapa; d) separación en segmentos de bloques cristalinos durante la tercera etapa; e) alineación de los bloques y de las cadenas de unión en la dirección de la tensión aplicada en la etapa final de deformación. [34].....	69
Figura 44.- Aspecto de la probeta debido a la estricción que sufre al ser sometida a tracción.....	70
Figura 45.- Deformación macroscópica asociada a curva típica tensión-deformación de un polímero semicristalino.	71
Figura 46.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE triturado.....	71
Figura 47.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE molido.	72
Figura 48.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE-1% MWCNT.....	72

Figura 49.- Gráficas con la comparación de los valores de las propiedades y sus desviaciones.	74
Figura 50.- Gráfica tensión deformación sin LDPE_T02.	75
Figura 51.- Gráficas con la comparación de los valores de las propiedades y sus desviaciones sin LDPE_T02.....	77
Figura 52.- Termogramas obtenidos a partir del primer calentamiento de los tres materiales bajo estudio.....	79
Figura 53.- Termogramas obtenidos a partir del primer enfriamiento de los tres materiales bajo estudio.	80
Figura 54.- Termogramas obtenidos a partir del segundo calentamiento de los tres materiales bajo estudio.....	81
Figura 55.- Curvas de análisis termogravimétrico de los materiales bajo estudio.....	84
Figura 56.- Termogramas diferenciales asociados a todos los materiales bajo estudio.	85
Figura 57.- Ejemplo representativo de las gotas de los tres líquidos empleados sobre LDPE.	87
Figura 58.- Evolución del ángulo de contacto del agua en relación a cada material.	88
Figura 59.- Evolución del ángulo de contacto del glicerol en relación a cada material.	89
Figura 60.- Evolución del ángulo de contacto del diyodometano en relación a cada material.	89
Figura 61.- Valores de energía libre superficial en función del material estudiado.....	91
Figura 62.- Espectros infrarrojos de los materiales bajo estudio.	92
Figura 63.- Espectros infrarrojos de los materiales bajo estudio, de manera separada.	93
Figura 64.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material de referencia LDPE triturado.	94
Figura 65.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material de referencia LDPE molido.	94
Figura 66.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material LDPE molido.....	95
Figura 67.- Gráfico UFC/ml según material.	96
Figura 68.- LDPE Triturado.	97
Figura 69.- LDPE Molido.	98
Figura 70.- LDPE-1% MWCNT.....	98
Figura 71.- LDPE Triturado.	100
Figura 72.- LDPE Molido.	100
Figura 73.- LDPE-1% MWCNT.....	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Masa de materiales ensayados por DSC.....	41
Tabla 2.- Propiedades de los líquidos utilizados	47
Tabla 3.- Valores de las propiedades de los materiales y sus correspondientes desviaciones.....	73
Tabla 4.- Valores de las propiedades de los materiales y sus correspondientes desviaciones sin LDPE_T02.....	76
Tabla 5.- Temperaturas de fusión y cristalización de los materiales bajo estudio.....	81
Tabla 6.- Entalpías de fusión y cristalización de los materiales bajo estudio.....	82
Tabla 7.- Valores de la cristalinidad de fusión y cristalización de los distintos materiales en tanto por uno.	83
Tabla 8.- Valores de los ángulos de contacto obtenidos con los distintos líquidos para cada material. ...	90
Tabla 9.- Valores de energía superficial y componentes dispersiva y polar de los materiales.	90
Tabla 10.- Número de bacterias totales por cuadrantes en cultivo sobre agar-agar procedentes de los distintos materiales bajo estudio.	96

RESUMEN

En este trabajo, se ha seleccionado como material de estudio polietileno de baja densidad, LDPE, ya que es un polímero con múltiples aplicaciones en diversos campos.

Se busca como objetivo principal, preparar y caracterizar nuevos materiales basados en LDPE con potenciales propiedades antibacterianas. Para ello, se van a estudiar dos posibles maneras de conseguirlo:

- La primera de ellas, consiste en realizar un procesamiento mecánico sobre el polietileno, concretamente, una molienda del alta energía con bolas de acero y en condiciones criogénicas.
- La segunda que se plantea, es preparar un material nanocompuesto, insertando nanotubos de carbono, CNT, en una matriz de polietileno de baja densidad, LDPE.

De esta manera se prepararon tres materiales basados en polietileno, el primero consistió en el polímero solamente triturado, el segundo es el polímero triturado y molido bajo condiciones criogénicas y el tercero es el polímero triturado, molido y con un 1% en peso de CNT.

Los materiales finales se prepararon en forma de películas (films) por prensado en caliente, utilizando una prensa de platos calientes.

Antes de realizar el estudio de la capacidad antibacteriana de cada uno de los materiales preparados, se caracterizaron mediante distintas técnicas y métodos. En particular se estudiaron y compararon las propiedades térmicas, mecánicas y estructurales del polietileno tradicional, el polietileno molido y material nanocompuesto, entre otras razones, para saber si las propiedades se mantienen en el LDPE, a pesar de los cambios introducidos. Esta caracterización se realizó mediante diferentes técnicas como son: ensayo de tracción, que proporciona información sobre las propiedades mecánicas, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) que aportan información sobre las propiedades térmicas, medidas de ángulo de contacto (análisis de mojabilidad), a través del cual, se obtiene la energía superficial del material y por último, espectrometría infrarroja (FTIR) que muestra información relativa a la estructura interna del material.

Después se procedió a estudiar el efecto antibacteriano en relación a la bacteria *Echerichia Coli* de los nuevos materiales frente al polímero base mediante técnicas de análisis de imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) y un ensayo de cultivo convencional sobre placa Petri.

Se observaron pequeños cambios poco significativos en las propiedades de los materiales ensayados, indicativo de que no disminuyen la calidad ni reducen el campo de aplicación de los mismos.

También se pudo ver que con los dos métodos de preparación propuestos, se reduce el número de bacterias sobre la superficie de los materiales, siendo más marcado el efecto antibacteriano, cuando se insertan nanotubos de carbono. Estos resultados son altamente novedosos pues es la primera vez que se describe el efecto antibacteriano de nanotubos de carbono en el interior de LDPE.

ABSTRACT

The present paper analyzes the Low-density polyethylene (LDPE), a polymer known by its multiple applications to various fields.

The main goal is to prepare and characterize new materials based on LDPE with antibacterial properties. For this purpose, two different options were explored:

- The first one is based on a mechanical process applied to the polyethylene, in particular, a high-energy milling with steel balls and under cryogenic conditions.
- The second way consists in preparing a nanocomposite through the insertion of carbon nanotubes (CNTs) in a LDPE matrix.

Three different materials were made following these procedures. The first one was the polymer just grinded, the second one grinded under cryogenic conditions and the third one grinded and with CNT added in a 1% its weight.

The materials were finally prepared as a pressed flat film using a hot-plate press.

Before the antibacterial properties of these materials were to be tested, different technologies were used to characterize them. In order to know whether the properties changed in the modified LDPE, the thermal, mechanic and structural properties of the three handled polyethylenes were analyzed and compared. This characterization was conducted through the following technologies: the tensile test provides information about mechanical properties; both Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric Analysis (TGA) about thermal properties; wetting performance analysis shows the material surface energy; and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), giving information related to the material's internal structure.

A further study determined afterwards the antibacterial effect of the Echerichia Coli bacteria upon the new materials in relation to the base polymer. That was carried out using scanning electron microscope (SEM) techniques and a conventional growing trial on a Petri dish.

Small and not significant changes in the material properties were observed, which means neither their quality, nor their application field diminishes.

Moreover, the bacteria over the material surfaces decreased in the two new proposed procedures. This antibacterial effect was more noticeable in the material with carbon

nanotubes. It is worth stressing the innovative side of this approach, since it is the first time that the antibacterial effect of carbon nanotubes in LDPE is proved.

1. INTRODUCCIÓN.

En la antigüedad, la alimentación se limitaba a los productos locales, se consumían en cada región los alimentos que en ella se cultivaban, siendo la alimentación muy básica.

Los envases, si existían, eran muy rudimentarios, por ejemplo, realizados en barro o madera. Estos envases eran pesados, frágiles y de gran tamaño dificultando su transporte. Con la evolución del comercio y la necesidad de transportar los alimentos, surgen materiales más versátiles, ligeros y resistentes. Gracias a ello, en la actualidad, se puede disfrutar en cualquier lugar de productos que se recolectan o se preparan en el otro extremo del planeta.

Una vez que se consiguen envases aptos para el transporte, donde lo que preocupa es su resistencia y ligereza, se busca cubrir la necesidad de que el producto se conserve en buenas condiciones y las mantenga por más tiempo, para que puedan llegar al cliente de manera óptima.[1]

El problema surge en los productos perecederos, que son más complicados de transportar, ya que es difícil mantenerlos en buen estado, puesto que existen agentes que merman su calidad y evitan que los productos sean consumibles. Las bacterias y los cambios de temperatura provocan que un alimento se estropee. Por ello, cobra gran importancia el envase que se utiliza para proteger el producto.

En cuanto a materiales se refiere, actualmente, existen infinidad de ellos, pero concretamente el uso de los plásticos, ha aumentado de manera exponencial en la industria en los últimos tiempos, cubriendo infinidad de necesidades.

Hay una gran variedad de plásticos y cada uno de ellos tiene unas propiedades determinadas, que son útiles para distintas aplicaciones. Esto provoca que haya unos polímeros que sean más utilizados que otros en función de las necesidades. En la Figura 1 se presenta un gráfico que indica en qué porcentaje se fabrica y utiliza cada uno de ellos:

INTRODUCCIÓN

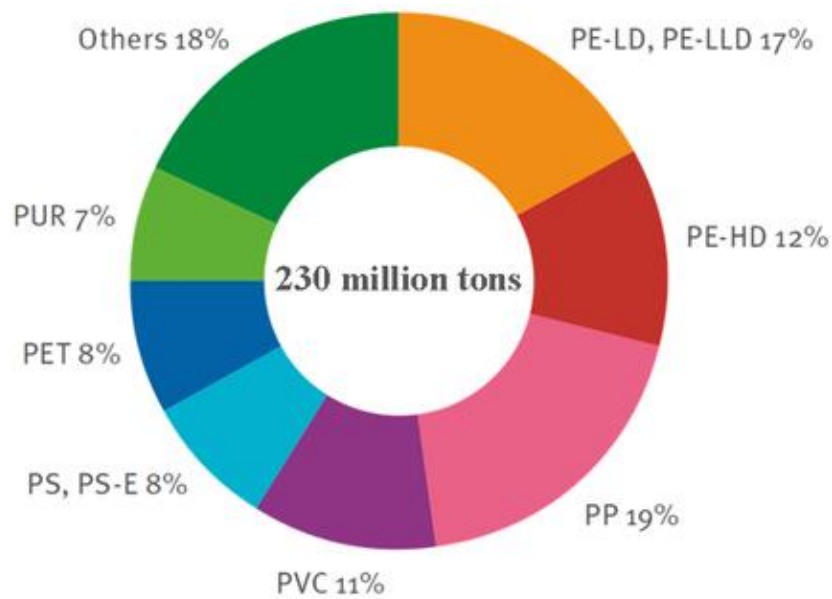


Figura 1.- Porcentaje de fabricación y utilización de los plásticos más convencionales. [2]

Como puede verse en el gráfico, los polímeros más utilizados en la industria en estos últimos años son el polipropileno (PP) y el polietileno de baja densidad (LDPE).

Las aplicaciones que tienen estos polímeros se han clasificado según su uso en la industria en cinco grupos: para envasado, para construcción, en el sector automovilístico, en electricidad y electrónica, y en otros sectores no tan destacados. En la Figura 2, se muestra un gráfico donde se puede ver la importancia y utilización de los plásticos en cada uno de estos grupos.

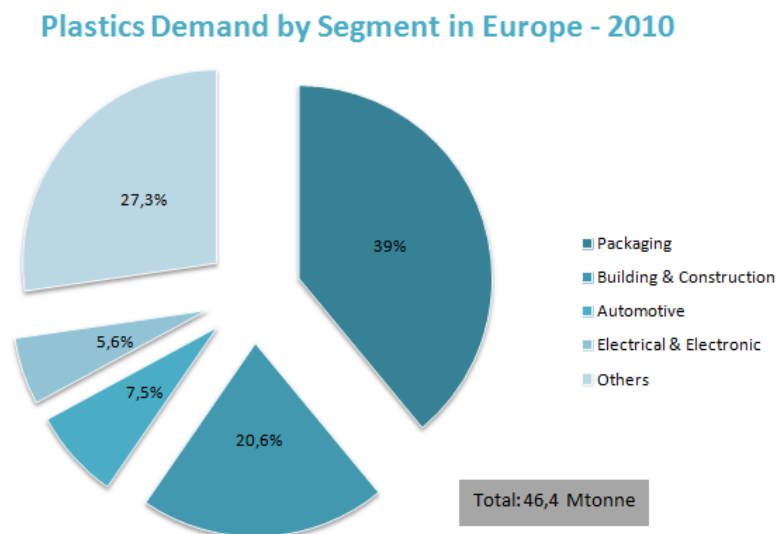


Figura 2.- Demanda de plásticos en función del sector industrial. [3]

INTRODUCCIÓN

Se puede observar que el sector que más polímeros utiliza es el sector de la industria de envasado, llevándose un 39% de la producción de plásticos, por tanto, es un dato a tener muy en cuenta a la hora de buscar nuevos polímeros, ya que la demanda en este sector es muy grande.

La industria del embalaje es muy variada y cubre muchos productos, puesto que la mayoría de ellos ya sean alimenticios o no, vienen envasados.

El envasado juega un papel muy importante en el producto en muchos aspectos, tanto en la preservación de sus características como en su estética, para que resulte atractivo y los clientes quieran adquirirlo.

En la Figura 3, se puede ver que más de un 66% de los embalajes se destinan para envasado de comida. Por tanto, la industria que mayor segmento de utilización de envases tiene, es la industria alimentaria.

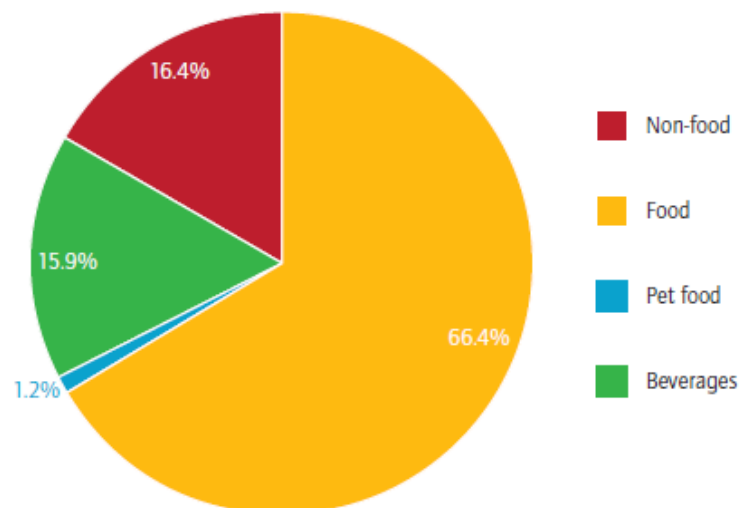


Figura 3.- Distribución de materiales de embalaje en función de su destino final. [4]

Viendo que una gran parte de los plásticos son destinados al sector del embalaje, y que dentro de estos, la mayor parte se destinan al envasado de comida, se pretende buscar un polímero, en este trabajo, que satisfaga las necesidades, que como se han comentado anteriormente, deben cumplir en la actualidad los envases para su uso en la industria alimentaria.

1.1 Objetivos.

El objetivo de este trabajo de investigación es conseguir un material adecuado para envasar alimentos. Para ello, tiene que tener unas características determinadas, como pueden ser, resistencia mecánica, pues el producto que vaya en su interior no debe sufrir daños en las operaciones de logística y transporte, debe de ser flexible, ya que deberá adaptar formas muy diversas para ajustarse al producto que se desea envasar, debe mantener sus propiedades con los cambios de temperatura, y en este proyecto en concreto, se busca conseguir un material que tenga propiedades antibacterianas, ya que tratándose de alimentos, es muy importante que el envase aisle y evite la proliferación de bacterias, consiguiendo mantener el producto en perfectas condiciones durante más tiempo, permitiendo así, que los alimentos puedan aumentar su vida útil y transportarse sin problemas.

Como indicaba la Figura 1, uno de los polímeros más utilizados es el polietileno de baja densidad, por lo que se ha decidido usar este material como base para el posible desarrollo de un material antibacteriano, ya que posee unas características muy apropiadas para envasar alimentos. Se caracteriza por su versatilidad, no tiene toxicidad para el ser humano, es inodoro, insípido y es un plástico termoplástico, que cuando se calienta hasta su temperatura de fusión, puede fluir y modificar su forma, lo que permite un reciclado fácil.

Por otro lado, como el polietileno de baja densidad no tiene propiedades antibacterianas, se busca modificarlo de tal manera, que sí cumpla esta condición; por ejemplo, preparando un material compuesto. En este trabajo en concreto, se ha decidido utilizar nanotubos de carbono, CNT, como modificador o relleno, y lo que se pretende es averiguar si efectivamente los CNT aportan propiedades antibacterianas. Se han elegido CNT, porque poseen propiedades hidrofóbicas, lo que debería hacerlos bastante compatibles con el LDPE y porque hay estudios en los que se ha conseguido inhabilitar bacterias con nanotubos de carbono, cuando éstos son alimentados con una tensión eléctrica. [5] Además, los materiales compuestos de matriz polimérica con nanotubos de carbono, tienen otro tipo de propiedades, como por ejemplo piezoeléctricas, y se buscan más propiedades para conseguir usos diferentes de este material compuesto y rentabilizar así su producción.

Por otro lado, también se va a estudiar si se puede conseguir un efecto antibacteriano, con un simple procesamiento mecánico del polietileno de baja densidad, como es la molienda criogénica con bolas de alta energía, sin necesidad de realizar un material compuesto, ya que si se

consiguieran propiedades antibacterianas con este proceso, no habría que realizar posteriores estudios de toxicidad del material, puesto que ya se sabe que el polietileno no es tóxico.

1.1.1 General.

Estudiar cómo afecta a las propiedades del polietileno de baja densidad, la realización de un proceso de molienda criogénica con bolas de alta energía y la presencia de nanotubos de carbono.

1.1.2 Específicos.

- Caracterizar el polietileno de baja densidad, después de haber sido sometido a un proceso mecánico de triturado.
- Caracterizar el polietileno de baja densidad triturado, después de haber sido sometido a un proceso de molienda criogénica.
- Caracterizar el material compuesto de polietileno de baja densidad como matriz con nanotubos de carbono como relleno.
- Estudiar la capacidad antibacteriana en los distintos materiales propuestos anteriormente.

2. FUNDAMENTOS.

2.1 Materiales compuestos.

Se denomina material compuesto a aquel que está formado por dos o más constituyentes materiales debidamente dispuestos entre sí, y se caracteriza porque las propiedades del material final son superiores a las que tienen los materiales constituyentes por separado. Esta característica hace que los materiales compuestos tenga una gran utilidad en el mundo de la ingeniería.

Los materiales compuestos se componen de dos o más fases en las que una es continua y recibe el nombre de matriz, mientras que la otra u otras se encuentran dispersas en el interior de la matriz y se denominan refuerzo.

Estos materiales se pueden clasificar en función del tipo de matriz que posean, teniendo así materiales compuestos de matriz polimérica, metálica o cerámica. Y según la forma del refuerzo, siendo materiales compuestos de partículas, de fibra o laminares.

Clasificación de materiales compuestos en función del tipo de matriz:

- **Matriz metálica:** aquellos materiales compuestos que poseen esta matriz, tienen una buena capacidad resistente, buena rigidez y tenacidad a la fractura, además de buen comportamiento frente altas temperaturas. Por otro lado, como desventaja, tienen alta densidad, lo que complica su mecanizado.

Con los materiales de refuerzo, se consigue mejorar el comportamiento a fluencia de la matriz, aunque con este incremento se reduzca la tenacidad. Los materiales compuestos con estas características son utilizados en elementos aeroespaciales y motores de automoción.

- **Matriz cerámica:** Este tipo de matrices aportan al material compuesto una gran resistencia a esfuerzos mecánicos y aguantan temperaturas altas sin modificar sus propiedades. Por el contrario, poseen una tenacidad y una conductividad térmica y eléctrica muy baja. Se sabe también, que aguantan bien los esfuerzos de compresión pero no los de tracción.

Con la adición de materiales de refuerzo a estas matrices, se consigue aumentar la tenacidad de los materiales cerámicos tradicionales, para poder utilizarlos en elementos estructurales. Su desventaja es que no siempre se consigue transferir una significativa cantidad de carga al refuerzo, de manera que el material rompe. Aparte tienen una gran complejidad, tanto en su comportamiento, como en su producción industrial. Son utilizados en transbordadores espaciales y en frenos para vehículos de competición.

- **Matriz polimérica:** En general, este tipo de matrices se caracteriza por su alta tenacidad, su baja densidad y por su buena resistencia a la corrosión y a los agentes químicos. Además, tienen la ventaja de que son muy fáciles de moldear y tienen un coste bajo. Como desventaja, no aguantan temperaturas muy altas y tienen baja resistencia mecánica.

Además, se puede distinguir entre las matrices de polímero termoestable, el cual está formado por cadenas poliméricas que reaccionan entre sí formando macromoléculas con numerosos enlaces covalentes entre ellas, confiriendo al material unas propiedades mecánicas, térmicas y de resistencia química muy elevadas, que los hacen aptos para múltiples aplicaciones.

Las matrices de polímero termoplástico, el cual está formado por moléculas unidas por fuerzas débiles (enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals), lo que les confiere la propiedad de reblandecerse y poder ser moldeadas por la acción del calor, endureciéndose al enfriar, siendo todo ello reversible. Todo esto, permite que estos materiales sean muy versátiles y reciclables.

Clasificación de materiales compuestos en función del tipo de refuerzo:

- **Reforzados con partículas:** Este tipo de refuerzo tiene aproximadamente las mismas dimensiones en todas las direcciones. El tamaño, la forma y la distribución de las partículas afectan a las propiedades del material compuesto y generalmente se consiguen mejores resultados si éstas son más pequeñas y redondeadas. Partículas en forma de bastones o esferas, se pueden tomar como ejemplo de aquellas que pertenecen a este grupo.
- **Reforzado con fibras:** tiene una dimensión mucho mayor en una de las direcciones. Las fibras que se utilizan suelen ser resistentes rígidas y frágiles.

Los materiales compuestos que se refuerzan con fibras consiguen mejor resistencia a la fatiga, mejor rigidez y mejor relación resistencia-peso.

Cuando el material compuesto es sometido a un esfuerzo, el material de la matriz transmite la fuerza a las fibras, las cuales soportan gran parte de la carga aplicada.

- **Reforzado con láminas.** Son refuerzos que poseen un espesor casi despreciable frente a las otras dimensiones. Se pueden clasificar en:

Materiales compuestos laminares, en los que aparecen paneles superpuestos unidos entre sí por un adhesivo, los cuales suelen estar reforzados con fibras y son anisótropos teniendo una dirección preferente más resistente a los esfuerzos.

Si se combinan láminas de distinta anisotropía se consigue un material isótropo que tiene la misma resistencia en varias direcciones.

Paneles sándwich que están formados por dos láminas separadas por un núcleo. Las láminas suelen ser más rígidas y resistentes y el núcleo suele estar formado por un material menos denso con baja resistencia y rigidez cuyas funciones son resistir la deformación perpendicular al plano de las láminas y ofrecer cierto grado de resistencia ante cizalladura en los planos perpendiculares a las caras.

2.2 Materiales antibacterianos.

En los últimos años la industria de los plásticos ha crecido en cuanto a preparación y comercialización de nuevos materiales aplicables a la agricultura y a la industria alimentaria.

En los ambientes donde la higiene es especialmente importante, como son el ámbito sanitario, el escolar, el sector del transporte y el de la alimentación, se ha hecho necesaria la utilización de materiales antibacterianos, que permitan minimizar el número de bacterias presentes en los materiales utilizados, dificultando su difusión al ambiente, ya que dadas unas condiciones determinadas, las bacterias pueden llegar a crecer de manera exponencial, formando colonias y produciendo sustancias tóxicas y peligrosas para el ser humano. [6]

En el caso concreto de la industria alimentaria, la demanda de productos frescos, la globalización del comercio y la distribución centralizada, suponen un desafío para la calidad y la seguridad del producto. Por ello, es necesario utilizar unos envases que prolonguen la vida de los alimentos y reduzcan el riesgo de contaminación por patógenos. Además, con estos envases, se consigue simplificar el tratamiento químico para la conservación de los alimentos. [7], [8].

Los envasados antibacterianos se pueden conseguir distintas maneras:

- Con la adición de bolsas o paquetes que contienen agentes antibacterianos en los envases.
- Con la incorporación de agentes volátiles y no volátiles directamente en los polímeros.
- Mediante el revestimiento o la adsorción de los agentes antibacterianos sobre las superficies de los polímeros.
- Uso de polímeros que son inherentemente antibacterianos.

2.3 Materiales nanocompuestos antibacterianos.

Una de las soluciones para conseguir materiales antibacterianos, es introducir nanopartículas con características bactericidas en una matriz del polímero que interese utilizar, consiguiendo de esta manera un material nanocompuesto con propiedades antibacterianas.

Se persigue conseguir, que los materiales nanocompuestos bactericidas, reduzcan el deterioro de los alimentos y eviten que proliferen bacterias patógenas, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que causan infecciones.

Las propiedades antibacterianas de un material, dependen, en gran medida, de la capacidad de adhesión que tengan las bacterias a la superficie del mismo; puesto que si existe una buena adhesión, las bacterias pueden nutrirse y reproducirse proliferando rápidamente.

En la actualidad se conocen varias nanopartículas que reducen la proliferación de bacterias. Cada una de ellas tiene un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo el cobre consigue alterar la integridad de las membranas celulares, provocando una disminución de los nutrientes y con ello la muerte de las células [9-11]. La plata produce unos iones que consiguen la inactivación de las bacterias [11, 12]. El óxido de titanio, gracias a la acción de la luz degrada compuestos orgánicos por oxidación o reducción, consiguiendo así propiedades bactericidas [13-17].

Por otro lado, para la obtención de materiales nanocompuestos, podrían ser interesantes como matrices poliméricas [18-23], entre otras, el polietileno-co-vinil acetato (EVA), que es un material que se ha utilizado en aplicaciones agrícolas [23, 24]. El polifluoruro de vinilideno (PVDF), el cual puede ser utilizado en prótesis inteligentes y en ingeniería de tejidos [25] y el polietileno, que es uno de los plásticos más utilizados en la agricultura y el empaquetado desde hace bastantes años, debido a sus buenas propiedades y bajo coste, por lo que sería muy conveniente mejorar su capacidad antibacteriana para utilizarlo en múltiples aplicaciones.

2.4 Polietileno de baja densidad (LDPE).

Los polímeros son los materiales más utilizados en la industria, éstos se pueden dividir en tres grandes grupos: termoplásticos, termoestables y elastómeros.

En este trabajo en concreto, se va a utilizar polietileno de baja densidad, que es un material de la familia de los termoplásticos de aspecto translucido y de color blanquecino, el cual, se fabrica con frecuencia en forma de películas delgadas o de pellets.

La ventaja más destacable para muchos de los materiales termoplásticos aplicables en la ingeniería, es que poseen densidades relativamente bajas. Otra característica a destacar de los materiales poliméricos es que son buenos aislantes eléctricos y térmicos; sin embargo tienen la desventaja de que la resistencia a tracción es baja.

El polietileno está formado químicamente por unidades repetitivas como la que aparece a continuación (Figura 4).

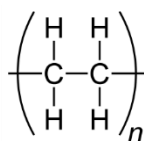


Figura 4.- Estructura unidad que se repite para formar polietileno.

A grandes rasgos Existen dos tipos principales de polietileno, el de baja densidad y el de alta densidad.

El polietileno de baja densidad fue el que primero se produjo comercialmente en el Reino Unido en 1939, usando reactores de autoclave que requerían presiones muy altas.

El polietileno de alta densidad fue producido comercialmente posteriormente hacia los años 1957, usando catalizadores especiales mediante los procesos Philips y Ziegler, los cuales redujeron la presión y temperatura de trabajo. Y hacia 1976, se desarrolló un proceso simplificado de baja presión para producir polietileno.

El polietileno de baja densidad tiene una estructura de cadena ramificada mientras que el de alta densidad tiene una estructura de cadena esencialmente lineal.

La cadena ramificada del polietileno reduce su grado de cristalinidad y su densidad, también afecta a la resistencia ya que esta disposición reduce las fuerzas de enlace intermoleculares.

PARTE EXPERIMENTAL

Por el contrario, el polietileno de alta densidad tiene pequeñas ramificaciones en las cadenas principales y por ello las cadenas se empaquetan más estrechamente incrementando la cristalinidad y la resistencia. En la Figura 5 se presenta un esquema de las cadenas asociadas a un polietileno de alta densidad y a uno de baja respectivamente.

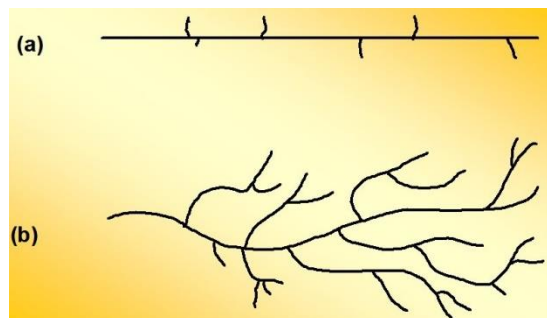


Figura 5.- Esquema representativo de una cadena de polietileno de alta densidad HDPE a) y de otra de baja densidad b).

Para este trabajo se ha seleccionado el polietileno de baja densidad porque es el más utilizado para empaquetado de alimentos.

El polietileno es sin duda el material plástico más usado y con más aplicaciones. El motivo principal de su éxito es su bajo coste y que tiene múltiples propiedades de importancia industrial. Entre las que destacan su buena flexibilidad incluso por debajo de los -73°C , su alta resistencia al impacto, su excelente resistencia a la corrosión y sus estupendas propiedades aislantes. Además tiene la suficiente resistencia como para utilizarse en muchos envases. También se puede destacar como propiedad importante, su carácter inodoro e insípido y no tóxico.

Las aplicaciones del polietileno incluyen entre otras, juguetes, bolsas, envases, recipientes, aislantes eléctricos, enseres domésticos, y botellas. Las películas de polietileno se usan para embalaje, para invernaderos y usos agrícolas y como material de revestimiento para estanques de agua.

2.5 Nanopartículas de nanotubos de carbono.

Existen dos tipos de nanotubos de carbono, los de pared simple (SWCNT – Single Wall Carbon Nanotubes) y los de pared múltiple (MWCNT – Multiple Wall Carbon Nanotubes) (Figura 6). Los primeros están constituidos por átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal

PARTE EXPERIMENTAL

cilíndrica, de forma que su estructura es la misma que se obtendría si se enrollara sobre sí misma una lámina de grafito. Sus extremos pueden estar cerrados por media esfera de fullereno o pueden estar abiertos. En el caso de los nanotubos de pared múltiple, están formados por una estructura similar a varios SWCNT concéntricos con diferentes diámetros. En ambos casos su principal característica, que dará lugar a un buen número de propiedades excepcionales, es que muestran una relación longitud/diámetro muy elevada: su diámetro es del orden de los nanómetros y su longitud puede variar desde unas micras hasta milímetros e incluso centímetros. [26].

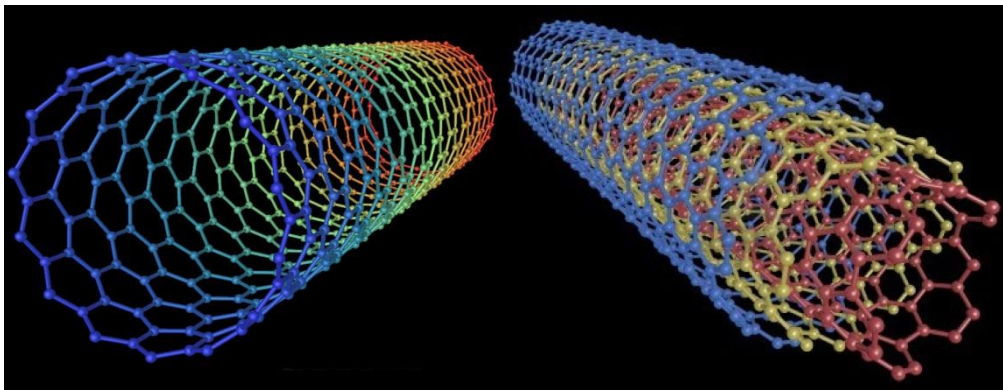


Figura 6.- Nanotubos de carbono de pared simple (izq.) y de pared múltiple (dcha.).

Los MWCNT fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima, un ingeniero japonés de la empresa NEC. Desde el principio mostraron importantes efectos cuánticos debidos a su estructura casi unidimensional, lo que incentivó a numerosos científicos a trabajar en ellos. Los SWCNT se descubrieron dos años después por el grupo de Iijima en NEC y por otro grupo en el IBM Almaden Laboratory.

A partir del descubrimiento, los científicos buscaron la forma de producirlos en el laboratorio, avanzándose mucho en los distintos métodos de síntesis que han ido surgiendo, así como en los de caracterización, purificación y separación.

Las propiedades son diferentes en los SWCNT y los MWCNT. Dependen, además, fuertemente de sus dimensiones (diámetro y longitud) y de los defectos presentes en el nanotubo (vacantes o impurezas ocupando el lugar de un átomo de carbono, deformaciones, inclinaciones, etc.). Pero también dependen de la forma en que están dispuestos los hexágonos de la lámina de grafito, es decir, de cómo se enrollaría la hipotética lámina de grafito que daría lugar al nanotubo. Los índices de Hamada (n,m) cuantifican esta cualidad de los nanotubos de

PARTE EXPERIMENTAL

carbono, dando lugar a tres grandes grupos: nanotubos armchari(n-m), nanotubos zigzag (m-0) y nanotubos chiral ($n \neq m \neq 0$).

En el mercado mundial los más utilizados son los MWCNT porque son más baratos de producir que los SWCNT. Los MWCNT se utilizan en aplicaciones donde el precio es más importante que la estructura del nanotubo, como el refuerzo de compuestos, mientras que los SWCNT son los preferidos en aplicaciones como la electrónica donde se necesitan nanotubos con gran perfección en su estructura aunque sean más caros.

Las excepcionales propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas, químicas y ópticas de los nanotubos de carbono les capacitan para ser utilizados en multitud de campos de aplicación, como puede ser la electrónica, los sensores, la instrumentación científica, la energía, la biotecnología y la química, la fotónica, la mecánica y los materiales.

Una de las propiedades más destacadas de los nanotubos de carbono es que son hidrófobos, es decir, repelen el agua, siendo esta una característica muy interesante para este proyecto, ya que se buscan materiales para embalaje y envasado.

A la hora de evaluar la toxicidad de los nanotubos, su diámetro es uno de los parámetros más importantes, ya que sus pequeñas dimensiones permiten que estos sean inhalados pudiendo pasar a los pulmones y a otros órganos, causando la muerte celular.

A medida que el diámetro de los nanotubos es menor, su toxicidad aumenta ya que estos presentan más facilidad para penetrar en las células.

Dado que se buscan materiales antibacterianos que van a estar en contacto con los seres humanos, se han elegido para este proyecto los MWCNT, puesto que los SWCNT presentan una toxicidad más alta en mamíferos.

Gran parte del poder antibacteriano de los nanotubos, radica en su mecanismo de acción, el cual consiste en someter a las bacterias a un estrés oxidativo que ocasiona rupturas en sus membranas celulares.

También este campo de la bioingeniería se han realizados filtros electroquímicos a base de nanotubos, los cuales cuando se someten a un pequeño voltaje, consiguen remover e inactivar virus y bacterias. [27]

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Materiales.

Se van a estudiar las propiedades de tres materiales.

El primero de ellos va a ser LDPE triturado, el segundo va a ser LDPE triturado y molido por molienda de bolas de alta energía en condiciones criogénicas, HEBM, y el tercero será un material compuesto de LDPE como matriz y un 1% en peso de nanotubos de carbono como material de refuerzo.

Aunque los dos primeros materiales en esencia son LDPE sin aditivos, se quiere estudiar como varían sus propiedades mecánicas, térmicas y bacterianas cuando se somete al polímero a una molienda criogénica. Sin embargo, con el tercer material se busca ver cómo varían las propiedades del LDPE cuando se le introduce un 1% de MWCNT como refuerzo.

3.1.1 Polietileno de baja densidad (LDPE).

El polietileno de baja densidad, LDPE, que se usó para todos los ensayos, fue suministrado en forma de granza por la empresa Sigma-Aldrich (densidad 0.925g/ml a 25°C y punto de fusión de 116 °C).

3.1.2 Nanotubos de carbono (CNT).

Como material de refuerzo se utilizaron nanotubos de carbono de pared múltiple, MWCNT, suministrados por la empresa Sigma-Aldrich con número de referencia de producto 724769 (densidad de 2.1 g/ml a 25 °C diámetro externo entre 6 - 9 nm y una longitud de 5 µm y cuya composición contiene más de un 95% de carbono).

3.2 Preparación de muestras.

3.2.1 Composición.

Todos los materiales se prepararon en forma de películas finas, films mediante un prensado final en caliente.

PARTE EXPERIMENTAL

Para realizar los films de los distintos materiales que se van a utilizar, se necesita:

1ª muestra:

LDPE triturado

Cantidad de la muestra: 3,5 gr.

2ª muestra:

LDPE triturado y molido

Cantidad de la muestra: 3,5 gr.

3ª muestra:

LDPE +1% en peso de MWCNT triturado y molido:

$$m_{muestra} = m_{MWCNT} + m_{LDPE} = 3,5 \text{ gr.} \quad (1)$$

$$1\% \text{ MWCNT} = \frac{m_{MWCNT}}{m_{MWCNT} + m_{LDPE}} \quad (2)$$

$$0,01 * \underbrace{3,5}_{m_{muestra}} = m_{MWCNT} \Rightarrow m_{MWCNT} = 0,035 \text{ gr} \quad (3)$$

$$0,01 * 3,5 \text{ gr.} = 0,035 \text{ gr.} \quad (4)$$

$$\underbrace{3,5}_{m_{muestra}} = \underbrace{0,035 \text{ gr}}_{m_{MWCNT}} + m_{LDPE} \Rightarrow m_{LDPE} = 3,465 \text{ gr.} \quad (5)$$

3.2.2 Preparación de films.

3.2.2.1 Trituración.

Se trituraron en total 20 gramos de LDPE.

Para la preparación de cada film, se necesitaron 3,5 gramos, no obstante siempre se prepara más cantidad, pues siempre hay pérdidas en la máquina trituradora y parte del polímero se suele perder en el proceso.

PARTE EXPERIMENTAL

El equipo utilizado para triturar fue un molino MF 10 Basic Microfine (Figura 7).



Figura 7.- Molino MF 10 Basic Microfine, para trituración.

Antes de triturar el LDPE es necesario enfriarlo en nitrógeno líquido durante unos 15 minutos para fragilizarlo y así conseguir, que el proceso de triturado sea más efectivo. Si se intenta triturar el LDPE a temperatura ambiente, lo único que se consigue es deformarlo, generando una masa que atasca la máquina trituradora.

Una vez que se ha enfriado en nitrógeno líquido, inmediatamente después se lleva a la tolva del molino y se tritura a 1500 rpm hasta que se consigue reducir todo el polímero a escamas de pequeño tamaño, como se puede ver en la imagen de la Figura 8:



Figura 8.- Escamas de LDPE obtenidas tras el proceso de trituración.

3.2.2.2 Molienda.

Uno de los tres materiales a estudiar va a ser polietileno triturado, por lo que no será necesario realizarle más procesados mecánicos, pero las otras dos muestras se van a someter a un proceso de molienda de bolas de alta energía bajo unas condiciones criogénicas. Para ello se va a utilizar un molino mezclador MM400 de la marca comercial RESTCH (Figura 9).



Figura 9.- Molino mezclador MM400 marca RESTCH para la molienda criogénica.

PARTE EXPERIMENTAL

Junto con 15 bolas de acero inoxidable con un diámetro de 9 mm, las muestras se depositan de manera individual en dos vasijas de acero inoxidable de 50cm³ de capacidad.

En cada recipiente, se introducen 3 gramos de muestra y se agitan con una frecuencia de 25 Hz durante una hora de molienda activa, pero utilizando ciclos de 5 minutos de molienda alternados con 15 minutos de inmersión en nitrógeno líquido, para alcanzar las condiciones criogénicas y así fragilizar el LDPE. De esta manera, tras la molienda, se consigue el polvo con las características deseadas (Figura 10).

Antes de poner en funcionamiento el molino, es importante asegurarse de que las vasijas están perfectamente cerradas. Para ello, se emplea Teflón en la rosca, consiguiendo que el recipiente sea estanco. Posteriormente, las vasijas se cierran y colocan adecuadamente en los brazos del molino para que no salgan disparadas. Por último, se cierra la carcasa de seguridad y se puede comenzar con el proceso de molienda.

Para la manipulación del nitrógeno líquido es fundamental utilizar guantes y gafas de seguridad para evitar quemaduras. Si se busca una correcta criogenización de los materiales, es necesario, que las vasijas estén totalmente cubiertas de nitrógeno líquido durante los 15 minutos estipulados entre ciclos de molienda.

De los dos materiales que se van a moler, uno de ellos es LDPE y otro es LDPE con un 1% en peso de CNT. En este segundo material, además de conseguir un polvo fino, se consigue una buena dispersión de los nanotubos de carbono. El resultado final de los dos materiales se puede ver en la Figura 10.



Figura 10.- Polvos obtenidos tras el proceso de HEBM:
lza.) Aspecto LDPE + 1% en peso de nanotubos de carbono molido
Dcha.) Aspecto del LDPE molido (dcha.).

3.2.2.3 Prensado en caliente

Se utilizó una prensa de platos calientes, de la marca Fontijne Presses TPB374, para obtener films de espesores de alrededor de 150 μm , a partir del prensado de los polvos y las escamas obtenidas en los procesos de triturado y molienda, descritos previamente.

Para ello, se utilizaron dos placa de aluminio pulidas, con unas dimensiones de 12 X 12 mm, sobre las que se colocaron láminas de Kapton (material antiadherente), formando una máscara, con dimensiones de 10 X 10 mm. Los films de Kapton empleados, con unas dimensiones iniciales 304 X 200 X 0.75 mm, fueron suministrados por la empresa Sigma-Aldrich. El aspecto final de las placas de aluminio, después de colocar la máscara de Kapton sobre ellas, es el que se muestra en la Figura 11.



Figura 11.- Aspecto final de placas de aluminio para prensado, después de colocar la máscara de Kapton.

Sobre la máscara de Kapton, realizada en las placas de aluminio, se coloca la cantidad estipulada de material para realizar el film y se extiende de la manera más homogénea posible (Figura 12).

PARTE EXPERIMENTAL



Figura 12.- Placa de aluminio recubierta de Kapton con polímero preparado para el prensado.

Después, se tapa con la otra placa y se introduce en la prensa de platos calientes, sometiendo al material a unas condiciones de presión y temperatura determinadas.

En el primer film, que se elaboró se utilizaron 3 gramos de material. Se sometió a las condiciones representadas en la Figura 13.

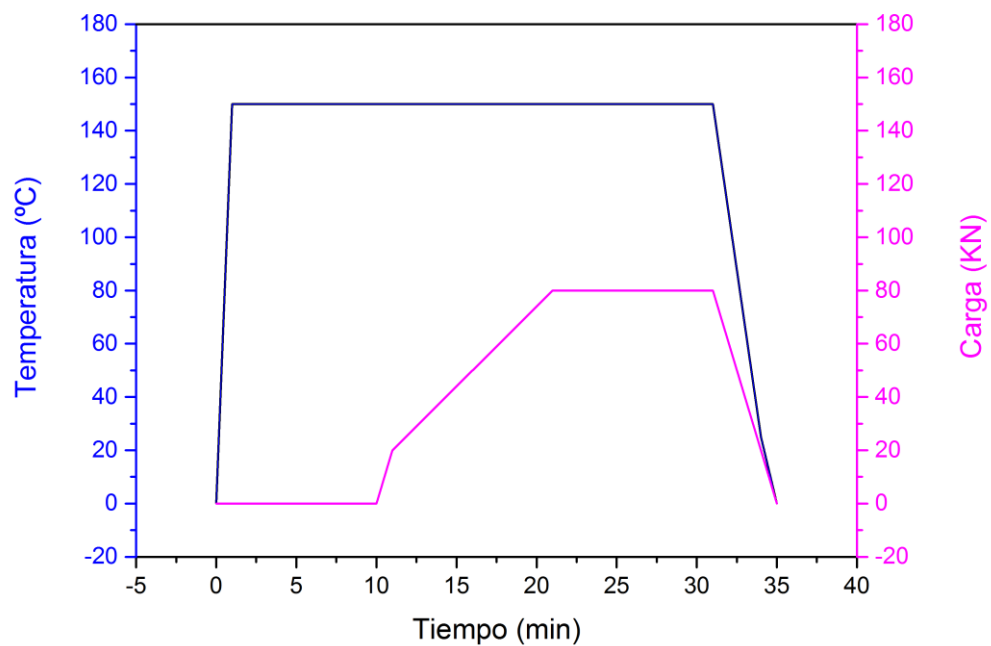


Figura 13.- Primeras condiciones de presión-temperatura-tiempo en la prensa de platos calientes para la obtención de los films.

PARTE EXPERIMENTAL

Con estas condiciones, se obtuvo un film que no era homogéneo, por lo que se decidió aumentar un poco la cantidad de material, usándose 3,5 gramos y se modificaron las condiciones del proceso de prensado utilizándose las que se describen en la Figura 14:

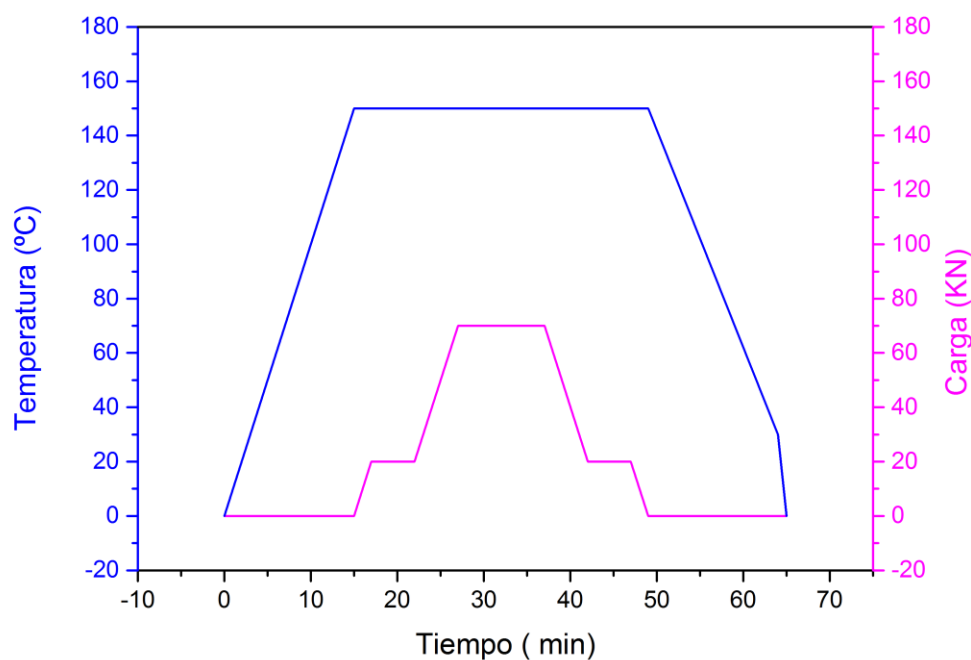


Figura 14.- Condiciones finales utilizadas de presión-temperatura-tiempo en la prensa de platos caliente para la obtención de los films.

Con una masa de 3,5 gramos y las condiciones descritas en la Figura 14, se consiguieron films bastante homogéneos con un espesor aproximado de 150 μ m. Por tanto, todos los films se obtuvieron siguiendo este último procedimiento.

El aspecto final del film después de salir de la prensa de platos calientes es el que se muestra en la Figura 15.



Figura 15.- Aspecto de un film de LDPE después del correspondiente proceso de prensado en caliente.

3.3 Técnicas y métodos experimentales.

3.3.1 Ensayo de tracción.

Para conseguir una buena caracterización de los materiales es importante estudiar sus propiedades mecánicas. Esta información es fundamental para saber qué funciones y qué productos se pueden producir con el polímero. Para ello se ha decidido someter al material a un ensayo de tracción. De esta manera se puede conocer el límite elástico, que es muy útil para saber la carga que es capaz de aguantar el material, antes de que se produzcan en él deformaciones permanentes. También se obtendrá la tensión máxima y la tensión de rotura, importante para saber hasta qué punto el polímero soporta las tensiones a tracción sin romperse. Estos datos son fundamentales para evitar el fallo del material en servicio. Por otro lado, el módulo de Young, da información de su rigidez, característica también importante a la hora de seleccionar un material en el mundo industrial [23], [24].

El equipo que se ha utilizado para llevar a cabo los ensayos es una máquina universal de ensayos de la serie Shimadzu Autograph (Figura 16).

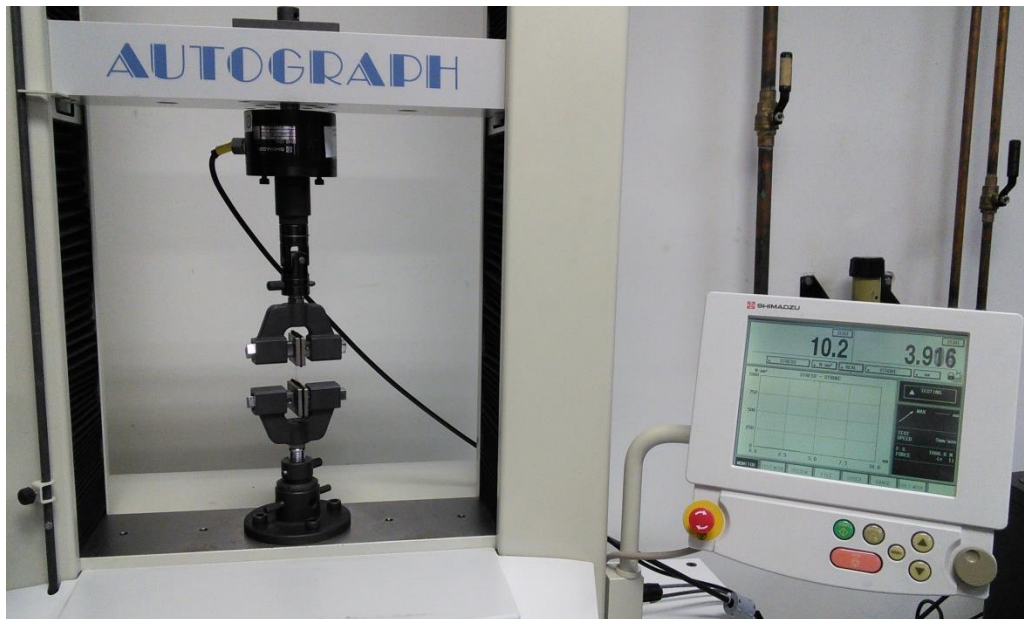


Figura 16.- Máquina universal de ensayos Shimadzu Autograp utilizada en la realización de los ensayos de tracción.

- Preparación de la probeta para los ensayos de tracción.

De los films que se habían elaborado previamente, se recortan las probetas, siguiendo las dimensiones que se indican en la norma ISO 3167:2002. A continuación se muestra un esquema con las medidas (Figura 17).

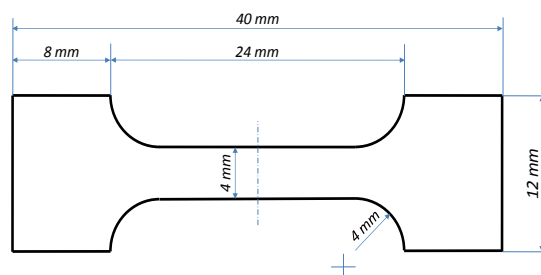


Figura 17.- Dimensiones probeta para ensayo a tracción según norma ISO 3167:2002.

De cada material se prepararon al menos 5 probetas (Figura 18) y de esas 5 se ensayaron 4 (siempre se deja una de reserva por si alguna rompiera mal o se dañara al colocarla en la máquina).

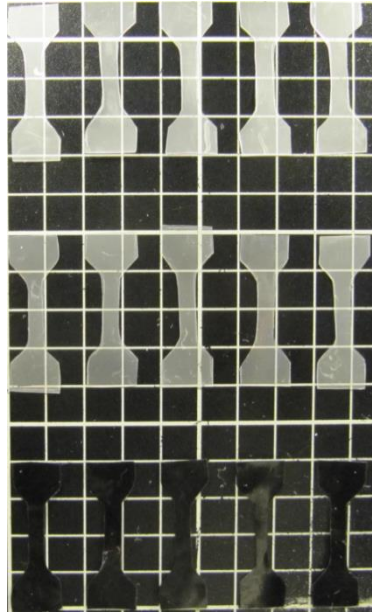


Figura 18.- Imagen de probetas de los distintos materiales preparados.

- Ensayos

Antes de comenzar a realizar los ensayos de tracción, se deben de medir las dimensiones de las probetas. Es muy importante cometer el mínimo error posible, ya que de ello van a depender los resultados finales.

Es necesario saber el ancho de la probeta y el espesor. Para medir el ancho se utilizó un calibre o pie de rey y para medir el espesor se empleó un micrómetro.

Como son probetas que se han elaborado a partir de unos films que pueden tener pequeñas variaciones en el espesor, se realizaron 11 medidas del espesor de cada probeta y se calculó una media aritmética de todas ellas para determinar su espesor medio. Por otro lado, se realizaron 3 mediciones del ancho de la probeta y se determinó de la misma manera el ancho medio.

En la Figura 19 se indican los puntos de las probetas donde, de manera aproximada, se realizaron las mediciones de espesor y ancho.

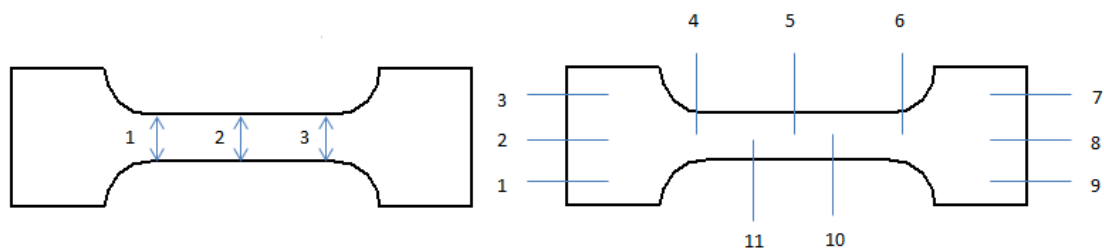


Figura 19.- Puntos de las probetas donde, de manera aproximada, se realizaron las mediciones de espesor y ancho.

- Preparación de la máquina de ensayos.

Antes de llevar a cabo el ensayo, es necesario realizar la programación y puesta a punto de la máquina universal de ensayos.

Para ello, se creó un método en el programa “trapezium”. En él se define la velocidad a la que las mordazas se van a ir separando, en concreto 5mm/min; así como la frecuencia de recogida de datos de tensión y deformación. Esto es muy útil entre otras cosas; por ejemplo, para definir un número de datos adecuados y no tener un exceso de puntos que generen mucho ruido en la gráfica y para no tener pocos, ya que de esta manera se pierde resolución. Estos valores se mantuvieron fijos para todos los ensayos.

Por otro lado, cada vez que se ejecuta el programa se introduce el espesor medio y el ancho de la probeta que se ensaya en cada momento.

- Colocación de la probeta.

Se coloca la probeta en las mordazas. En otros tipos de ensayo donde las probetas son rígidas, no es necesario extremar las precauciones a la hora de apretar las mordazas, pero en el caso de este polímero, y concretamente con films de tan pequeño espesor, el material es muy endeble tendiendo a curvarse, por ello es necesario separar manualmente las mordazas hasta que esa curvatura desaparece (Figura 20).



Figura 20.- Probeta en las mordazas de la máquina de tracción.

Una vez que se tiene la probeta colocada, se inicializa el programa de la máquina, llevando a cero la fuerza y la deformación y en ese momento se puede comenzar el ensayo.

3.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Uno de los aspectos fundamentales de la caracterización de los materiales plásticos es conocer su comportamiento térmico, y para ello es fundamental estudiar sus transiciones térmicas, así como las temperaturas o intervalos de temperaturas que en ellos ocurren (transiciones vítreas, fusiones, cristalizaciones, degradaciones térmica,...). Esta información es primordial para posteriormente poder optimizar las condiciones de procesamiento de dichos materiales, así como tener bajo control cualquier proceso de degradación o fallo que pueda sobrevenir por efecto de la temperatura.

En este trabajo, en relación al comportamiento térmico de los materiales bajo estudio, se pretende entender el efecto que la presencia de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) tiene sobre la fusión y cristalización del polietileno de baja densidad (LDPE). Precisamente es la calorimetría diferencial de barrido la técnica más simple y precisa a la hora de obtener dicha información.

Los experimentos se realizaron en un Calorímetro Mettler Toledo 822e bajo atmósfera de nitrógeno (Figura 21).

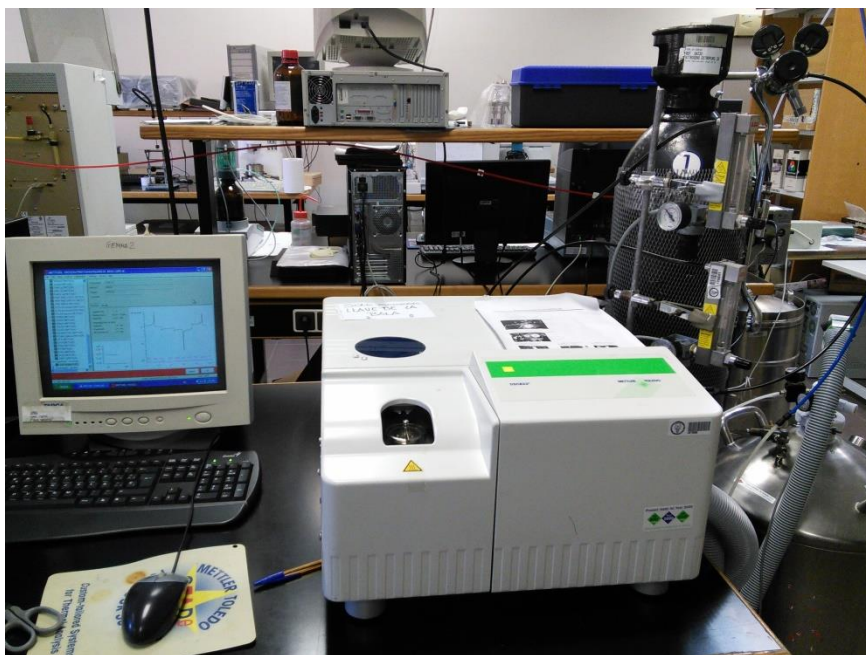


Figura 21.- Calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo 822e.

a) Secuencia térmica.

El esquema de la secuencia térmica que se implementa en el programa que va a controlar la calorimetría es el siguiente.

Se realiza un primer calentamiento, que comienza desde los 30 °C y se aumenta progresivamente la temperatura hasta los 170 °C a una velocidad constante de 10 °C/min. En este primer calentamiento se realiza un borrado de la historia térmica del material.

Una vez alcanzados los 170 °C se mantiene la muestra a esta temperatura durante 10 min.

Posteriormente, se realiza un descenso progresivo desde los 170 °C hasta los 30 °C, a una velocidad constante de 10 °C/ min, como en el calentamiento previo.

Y finalmente, se realizará un segundo calentamiento desde los 30 °C hasta 170 °C a la misma velocidad que el calentamiento anterior.

Una vez que el programa está creado, se prepara la muestra que se va a ensayar.

b) Preparación de muestras.

Se corta un fragmento (1.5-2 mg) del film que se quiere analizar, y se introduce en una cápsula de aluminio (Figura 22), que se ha colocado en una balanza analítica y se ha tarado previamente. Se pesa y se apunta el valor de la masa, ya que este ensayo se realizará tres

PARTE EXPERIMENTAL

veces, una por cada material, y es importante usar aproximadamente el mismo valor de masa para todos ellos, y la misma geometría, ya que de este modo la comparación entre materiales, será más precisa.



Figura 22.- Cápsula de aluminio que se utiliza para realizar el DSC.

Las cantidades de masa de los distintos materiales que se usaron fueron las que se indican en la Tabla 1:

Material	Cantidad de masa
LDPE Triturado	1.84 mg
LDPE Triturado y molido	1.81 mg
LDPE Triturado y molido con 1% en masa de MWCNT	1.79 mg

Tabla 1.- Masa de materiales ensayados por DSC.

A continuación, se sella la cápsula con una tapa de aluminio con el material dentro y se le practica un pequeño agujero en la tapa para conseguir que se realice el ensayo a presión constante y se coloca en su posición en el horno del DSC, y en la otra posición se coloca una cápsula vacía de igual tipo y forma, que será la de referencia (no sufre ninguna transformación térmica en el intervalo de temperaturas estudiado).

Cuando el ensayo finaliza, se obtiene en el ordenador conectado al DSC una gráfica similar a la que aparece a continuación (Figura 23). Se rescatan los datos obtenidos y se analizan los resultados.

La temperatura de fusión se obtiene del gráfico, tomando el valor que se alcanza en el pico endotérmico en el proceso de calentamiento (Figura 23), y por consiguiente la temperatura de

PARTE EXPERIMENTAL

cristalización se consigue tomando el valor que alcanza en el pico exotérmico durante el enfriamiento (Figura 23).

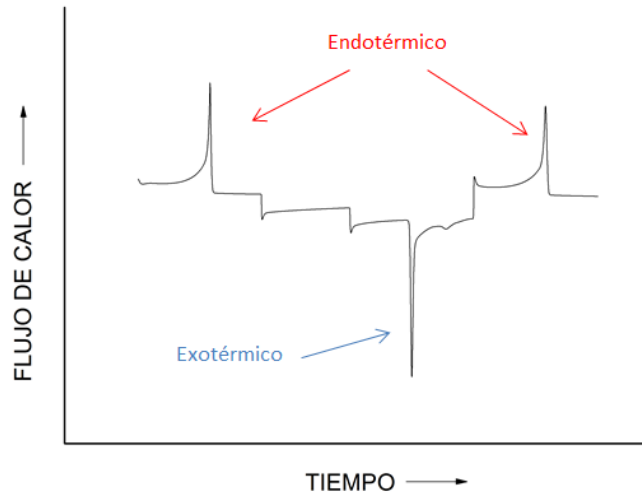


Figura 23.- Termograma típico de un polímero semicristalino obtenido por DSC.

Por otro lado, para calcular las entalpías de fusión y de cristalización se tiene que integrar el pico endotérmico y exotérmico respectivamente.

Estas entalpías se van a utilizar para calcular el grado de cristalización del material en cada proceso, utilizando la siguiente fórmula:

$$\chi_f = \frac{\Delta H_f}{(1-X) * (\Delta H_m(100\%))} \quad (6)$$

Donde X es la fracción en peso de material de relleno (en nuestro caso MWCNT).

Por tanto, $X = 0$ en los dos primeros materiales estudiados, ya que no son materiales compuestos y todo el contenido de la muestra, es LDPE puro.

En el tercer material, que es un compuesto en el que se tiene una matriz de LDPE y un refuerzo de un 1% en masa de MWCNT, $X = 0.01$, tomando este valor, para quitar la masa que no pertenece al polímero. [23]

3.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA).

En el análisis termogravimétrico se registra la pérdida de peso de una muestra según se incrementa la temperatura bajo condiciones controladas de velocidad de calentamiento, en una atmosfera inerte. De esta manera se obtienen los termogramas (TG) y las curvas de análisis termo gravimétrico diferencial (SDT).

Una característica fundamental de la TGA es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso, mientras que no permite estudiar procesos como fusiones o transiciones de fase.

Las medidas de TGA se han llevado a cabo en una termo balanza modelo TGA-SDTA 851 Mettler Toledo, en el Departamento de Química y Edafología de la Universidad de Navarra.

Los crisoles que se utilizaron para todos los ensayos tenían una capacidad de 70µl. Se realizaron calentamientos desde la temperatura ambiente hasta los 600°C. Estos calentamientos se produjeron a una velocidad de 10°C/ min. Todo ello se llevó a cabo en una atmósfera inerte en nitrógeno, con un caudal de 20ml/ min.

Este ensayo, que proporciona los valores de la temperatura a la cual se producen los procesos de descomposición térmica, se ha realizado como complemento a la información obtenida en el ensayo de la Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC), desarrollado en el punto 3.3.2, en el cual ya se han estudiado los procesos de fusión, cristalización y transiciones de fase de cada material.

3.3.4 Energía superficial y ángulo de contacto.

Se ha decidido obtener la energía superficial de los materiales y el ángulo de contacto entre el sólido y el líquido porque a través de estos parámetros, se puede determinar la mojabilidad del material, saber lo hidrofóbico o hidrófilo que es e incluso el tipo de interacciones específicas que puede tener con diferentes líquidos y materiales.

La información que se obtenga, puede ayudar a comprender el comportamiento antibacteriano de los materiales, pues muchos de los argumentos asociados a la mayor o menor proliferación de bacterias sobre diferentes sustratos se basan en la consideración de una mejor o peor adhesión de los microorganismos a las correspondientes superficies.

PARTE EXPERIMENTAL

El equipo utilizado para llevar a cabo el experimento es un tensiómetro basado en el método de la gota OCA 15 suministrado por KRÜSS GmbH.

Está compuesto por una base para colocar el material en estudio y un soporte en el que irá anclada una jeringuilla. Con ella, se deposita una gota del líquido que se ha seleccionado, sobre la muestra de material.

Posteriormente, una cámara capta la imagen de la gota (se dispone de luz artificial mediante una bombilla para iluminar más o menos la muestra hasta conseguir una luz adecuada para obtener una buen contraste en imagen). Mediante un programa de ordenador se realiza un ajuste del perfil de la gota y se determina el ángulo de contacto entre la gota y el sustrato.

Para tener un conjunto suficiente de medidas en el que los valores promedio finales sean fiables se analizaron en cuatro gotas de cada líquido sobre cada material.

Es importante a la hora de realizar las mediciones que las gotas se dispensen de igual manera en todos los casos para conseguir una mayor repetitividad. Y también se debe de emplear el mismo tiempo en capturar cada una de las gotas, ya que hay líquidos que se evaporan con facilidad y esto puede modificar los resultados.

En 1805, Thomas Young define el ángulo de contacto θ mediante el análisis de las fuerzas que actúan sobre una gotita de fluido en reposo sobre una superficie sólida rodeada por un gas [30].

El método que se va a utilizar para la determinación de la energía superficial es el método OWRK: Método de Owens, Wendt, Rabel y Kaelble. [31]

A continuación se muestra un esquema, que detalla los parámetros que se van a utilizar:

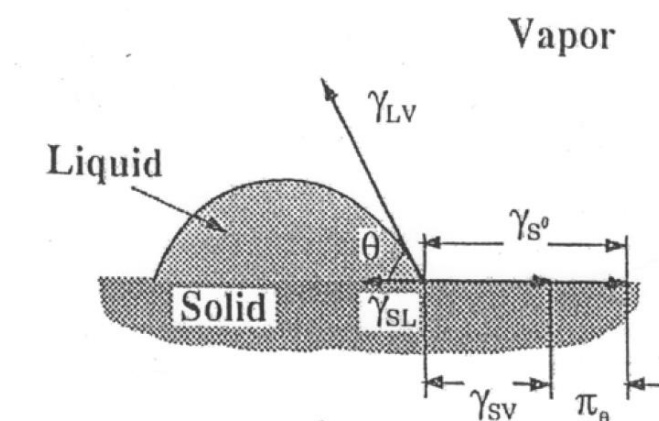


Figura 24.- Esquema representativo de la medida del ángulo de contacto.

PARTE EXPERIMENTAL

De la observación del esquema y por resta vectorial se tiene:

$$\gamma_{LV}\cos\theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (7)$$

Por otro lado:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 2\sqrt{\gamma_{SV}^d\gamma_{LV}^d} - 2\sqrt{\gamma_{SV}^p\gamma_{LV}^p} \quad (8)$$

Donde “d” representa la dispersión y “p” la interacción polar.

Y combinando ambas expresiones se llega a ecuación principal del método:

$$\gamma_{LV}(\cos\theta + 1) = 2\sqrt{\gamma_{SV}^d\gamma_{LV}^d} + 2\sqrt{\gamma_{SV}^p\gamma_{LV}^p} \quad (9)$$

Para conseguir una relación lineal, y poder representarlo en una gráfica obteniendo una recta, se pasa el 2 de la derecha dividiendo y se dividen ambos términos por $\sqrt{\gamma_{SV}^d\gamma_{LV}^d}$ obteniéndose:

$$\underbrace{\frac{0,5*\gamma_{LV}(\cos\theta+1)}{\sqrt{\gamma_{SV}^d\gamma_{LV}^d}}}_{\text{eje } y} = 1 + \underbrace{\frac{\sqrt{\gamma_{SV}^p\gamma_{LV}^p}}{\sqrt{\gamma_{SV}^d\gamma_{LV}^d}}}_{\text{eje } x} \quad (10)$$

Pudiéndose representar gráficamente, como se indica en la ecuación.

En este método, se necesitan al menos tres líquidos para poder obtener el valor de la energía superficial del material.

Los valores de las componentes y del ángulo de cada líquido se sustituyen en la ecuación anterior, se representan en una gráfica y se busca la línea de tendencia de la siguiente manera:

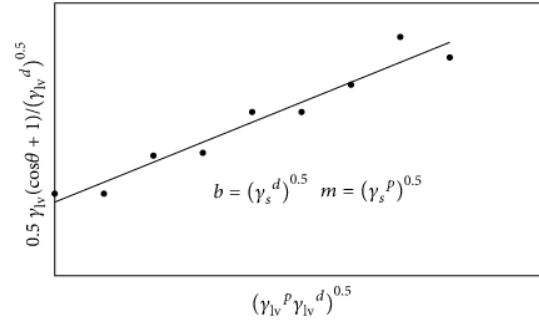


Figura 25.- Ajuste lineal asociado a la aplicación del método OWRK.

De esta línea de tendencia se obtiene la componente polar y la dispersiva de la energía superficial del material en estudio de la siguiente manera:

$$b \rightarrow \gamma_s^d = b^2; m \rightarrow \gamma_s^p = m^2 \quad (11)$$

Y por tanto la energía superficial total del material:

$$\text{Energía Superficial: } \gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (12)$$

Después de haber visto, cómo se obtiene cada una de las componentes de la energía superficial y el valor total de la misma se procede a seleccionar los líquidos que se van a utilizar en este ensayo.

Existen muchos líquidos con los que se puede llevar a cabo este experimento, en realidad el único requisito que tienen que cumplir es que sus características, sean conocidas.

Se eligen como líquidos para el cálculo de la energía superficial: agua, glicerol y diyodometano.

El agua, se selecciona, porque la evolución del ángulo de contacto de los materiales, con este fluido, va a ser muy importante a la hora de analizar el comportamiento antibacteriano de los mismos.

El glicerol y el diyodometano, se escogen para completar el experimento, porque tienen características diferentes, el primero polar y el segundo poco polar cumpliendo así, propiedades de un número más amplio de líquidos.

A continuación se muestra en la Tabla 2 los líquidos utilizados junto con sus propiedades:

	δ (g/cm ³)	γ^d (mN/m)	γ^p (mN/m)	γ^t (mN/m)	Proveedor
Agua	1	21,8	51	72,8	UC3M
Glicerol	1,259	37	26,4	63,4	Panreac
Diyodometano	3,22	50,8	0	50,8	Sigma-Aldrich

Tabla 2.- Propiedades de los líquidos utilizados

Donde δ es la densidad del líquido, γ^d la componente dispersiva de la tensión superficial, γ^p la componente polar de la tensión superficial, y γ^t el valor total de la tensión superficial.

El valor utilizado de tensión superficial de los líquidos es el publicado por el autor Stöm et al. [32]

3.3.5 Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El principio básico de la espectrometría infrarroja es que las moléculas pueden absorber energía de la luz que les llega, a longitudes de ondas específicas correspondientes a la región del infrarrojo en el espectro electromagnético, para activar movimientos vibracionales asociados a grupos atómicos unidos por enlaces covalentes. De esta manera, viendo las bandas de absorción en el infrarrojo es posible, no sólo identificar los grupos existentes (cuyas vibraciones se activan) sino que también es posible, a partir de la medida de absorbancia (logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia o fracción de luz transmitida), determinar la cantidad de dichos grupos absorbentes.

Un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier funciona con una pequeña muestra que es colocada en una celda, donde es sometida a una fuente de luz policromática infrarroja (de 4000 cm⁻¹ hasta 600 cm⁻¹). La espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier está basada en: a) el interferómetro de Michelson de barrido - aplicable en todo el intervalo de frecuencias - y b) en la transformada de Fourier. Estos interferómetros modulan cada longitud de onda infrarroja permitiendo que todas alcancen el detector durante el tiempo de medida.

El espectrómetro con transformada de Fourier utilizado fue un Nicolette Avatar ATR-FTIR 360 del departamento de química y edafología de la universidad de navarra. Para el ensayo de

PARTE EXPERIMENTAL

todas las muestras se realizaron 32 barridos, utilizando una región infrarroja entre 600 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y el programa utilizado para analizar los espectro fue el OMNIC ESP software v5.1 (Nicolet).

El principal valor de la espectrometría infrarroja reside en que proporcionar análisis rápidos y económicos.

Este ensayo ha sido realizado para comprobar que los distintos mecanizados y procesos de conformación, no modifican la estructura interna del polímero, ya que es importante saber si éste mantiene sus propiedades iniciales.

3.3.6 Análisis bacteriológico.

3.3.6.1 Procedimiento de elaboración de biofilms.

Para la realización del cultivo se ha elegido la bacteria DH5 α que es una cepa de la bacteria Escherichia Ecoli. para todos los ensayos bacterianos. Se utiliza para aplicaciones de clonación de rutina.

Esta cepa de E. Coli no es patógena, esto es, que no produce enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea humano, animal o vegetal.

Primer procedimiento de elaboración de biofilms:

Para la preparación de los materiales es necesario cortar un cuadrado de material de unos 8mm de lado. Se pega a un porta de acero, para ello se elige como adhesivo resina epoxi bicomponente y se siguen las indicaciones de secado; que en este caso fueron; dejar secar a temperatura ambiente durante 24h. Quedando finalmente como se muestra en la Figura 26.

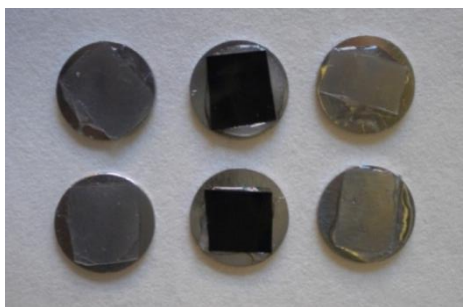


Figura 26.- Probetas preparadas para la realización de los biofilms.

PARTE EXPERIMENTAL

Es necesario desinfectar los materiales para evitar que estén contaminados.

En el primer experimento que se realizó, se desinfectaron los materiales metiéndolos en un autoclave, a temperaturas por encima de los 120 °C, esto supuso la fusión del polietileno con el consiguiente deterioro de las muestras. Por tanto esta opción fue descartada.

Se decidió realizar la limpieza en una cabina del laboratorio con diferencia de presiones y trabajando siempre bajo la campana de cristal, rociando el material con etanol al 70%, como se puede ver en la imagen de la Figura 27 y posteriormente dejándolo secar al aire. De esta manera quedan preparadas las muestras para la realización del ensayo bacteriano.

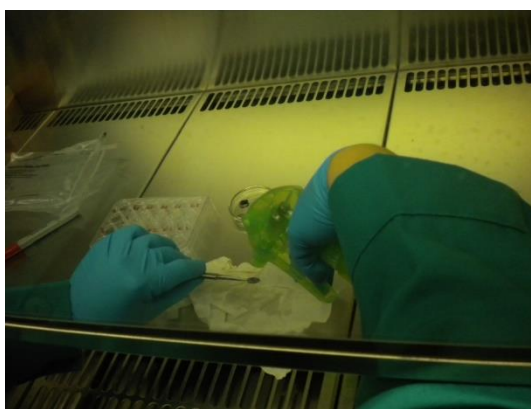


Figura 27.- Limpieza con etanol de las probetas.

Para proceder a la preparación de las bacterias se coge una alícuota de ellas, que ha sido congelada en nitrógeno líquido hasta los -80°C para su conservación, y se descongela en hielo durante 15 min. Dichas bacterias, se dejan incubando durante 24 horas para que salgan del letargo y crezcan.

Una vez transcurrido este tiempo se va a realizar una **disolución stock** compuesta por bacterias y un medio de cultivo. En este caso se ha elegido como medio de cultivo Luria Bertani (LB) que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.

La proporción en la que se mezclaron es la siguiente:

$$20 \mu\text{l bacterias} + 980 \mu\text{l LB} \rightarrow 1 \text{ ml disolución stock} \quad (13)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Se prepararon 3 ml de la disolución stock como volumen final:

$$\underbrace{20 \mu l \text{ bacterias} * 3}_{60 \mu l \text{ bacterias}} + \underbrace{980 \mu l \text{ LB} * 3}_{2940 \mu l \text{ LB}} \rightarrow 3 \text{ ml disolución stock} \quad (14)$$

Esta disolución stock se tiene incubando durante 24 horas aproximadamente en condiciones de 37° C y en agitación. Es necesario que incuben, porque al descongelarse las bacterias están aletargadas, entonces de esta manera se consigue que las bacterias recuperen sus propiedades y se pueda trabajar con ellas.

De esta disolución stock, se van a sacar las diluciones (*la dilución es la reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución*), con las que se van a trabajar. De esta manera se cometen menos errores, ya que todas parten de una disolución madre.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se preparan las diluciones.

En el primer ensayo realizado, se buscó una cantidad de bacterias adecuada, en la que no hubiera ni muchas ni pocas. Si hay pocas colonias se comete mucho error al comparar los materiales. Y si hay muchas se forma una película de colonias que imposibilita su conteo.

Como consecuencia, se prepararon 2 diluciones distintas y posteriormente se eligió para el ensayo aquella que tenía un número óptimo de colonias para la realización del conteo.

Como disolvente se utilizó LB y las diluciones tuvieron las siguientes proporciones:

- 1/10: por cada ml de dilución se va a tener 9/10 de LB y 1/10 de disolución madre

$$\frac{1}{10} \text{ bacterias} + \frac{9}{10} \text{ LB} \rightarrow 1 \text{ ml} \left(\text{dilución } \frac{1}{10} \right) \quad (15)$$

- 1/50: por cada ml de dilución se va a tener 49/50 de LB y 1/50 de disolución madre

$$\frac{1}{50} \text{ bacterias} + \frac{49}{50} \text{ LB} \rightarrow 1 \text{ ml} \left(\text{dilución } \frac{1}{50} \right) \quad (16)$$

Se prepararon tres materiales diferentes. Por cada material se hicieron cuatro muestras con biofilms, dos con una dilución 1/10 y dos con una dilución 1/50, para posteriormente realizar ensayos de microscopía y cultivo, como se indica en el esquema:

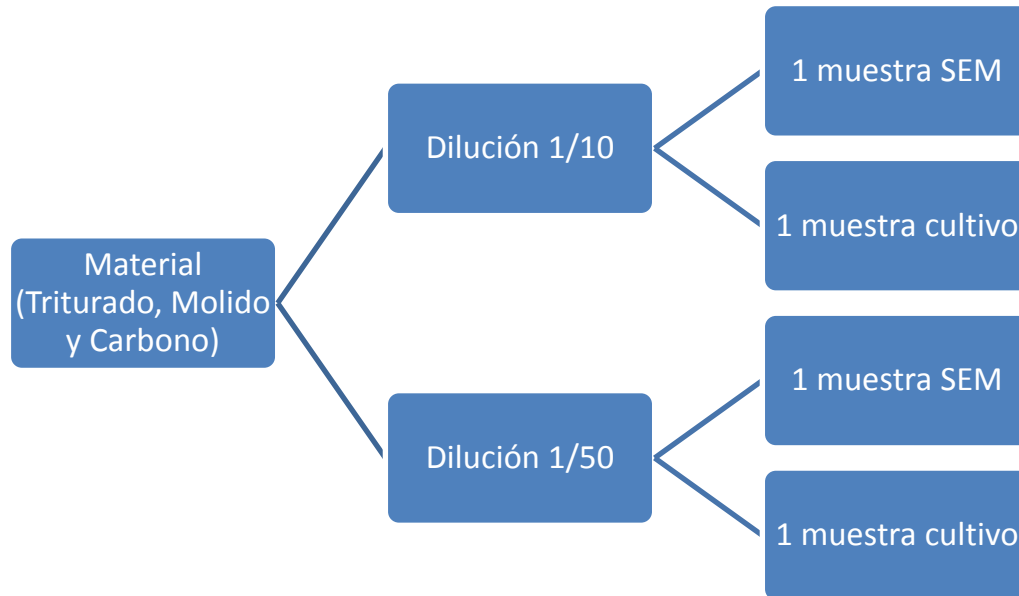


Figura 28.- Esquema primer procedimiento.

El volumen final de dilución 1/10 que se preparó fue de 12 ml y de la dilución 1/50 también fue de 12 ml:

$$3 \text{ materiales} \times 2 \text{ muestras} / \text{material} \times 2 \frac{\text{ml}}{\text{muestra}} = 12 \text{ ml dilución } \frac{1}{10} \quad (17)$$

Preparación de los 12 ml:

El volumen final en ambas diluciones es el mismo, pero no tiene el mismo contenido.

Las diluciones consistieron en lo siguiente:

- Dilución 1/10:

$$\underbrace{\frac{1}{10} \text{ bacterias} * 12 \text{ ml}}_{1,2 \text{ ml bacterias}} + \underbrace{\frac{9}{10} \text{ LB} * 12 \text{ ml}}_{10,8 \text{ ml LB}} \rightarrow 12 \text{ ml} \left(\text{dilución } \frac{1}{10} \right) \quad (18)$$

- Dilución 1/50:

$$\underbrace{\frac{1}{50} \text{ bacterias} * 12 \text{ ml}}_{0,24 \text{ ml bacterias}} + \underbrace{\frac{49}{50} \text{ LB} * 12 \text{ ml}}_{11,76 \text{ ml LB}} \rightarrow 12 \text{ ml} \left(\text{dilución } \frac{1}{50} \right) \quad (19)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Una vez obtenidas las diluciones se procede a realizar los biofilms.

Para proceder a la preparación de los biofilms, se coge una placa microtitulada y se coloca cada una de las muestras de material polimérico que se han preparado en un pocillo distinto. El siguiente paso es echar los 2 ml de la dilución correspondiente en cada pocillo, como se puede observar en la siguiente imagen.

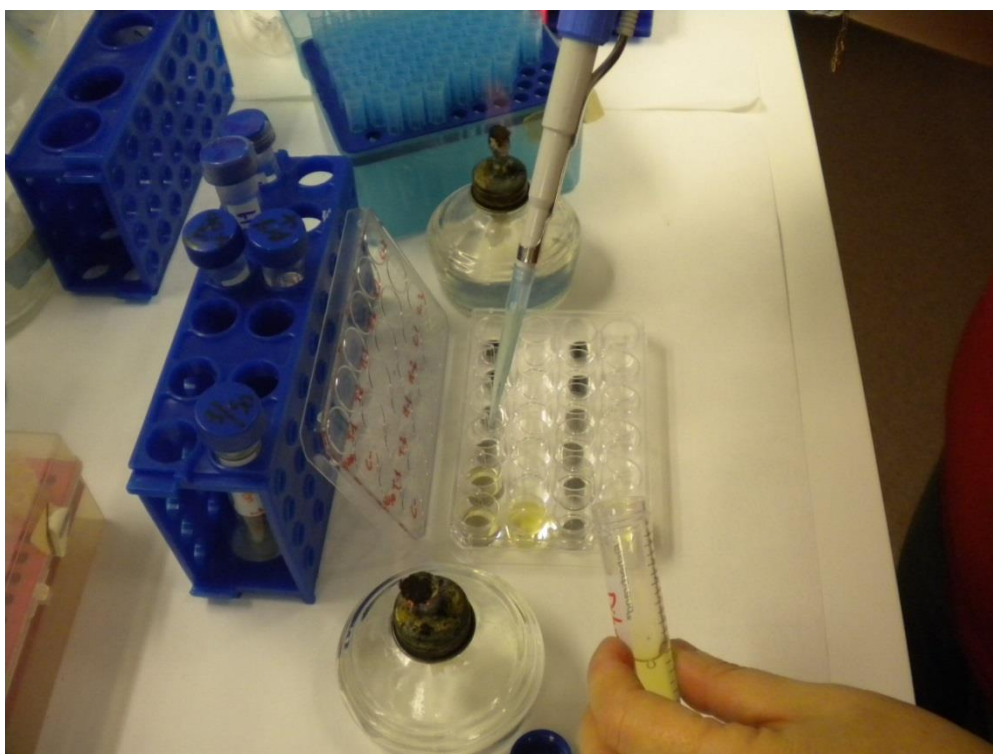


Figura 29.- Pipeteado de las bacterias sobre los materiales.

Una vez pipeteadas todas las muestras, se deja la placa microtitulada en agitación durante 3 horas a 37 °C, para que las bacterias se adhieran a los materiales y así generar los biofilms. Se deja en agitación, para que se homogenice la mezcla y se distribuya por todo el material. Se mantienen a 37 °C, porque es la temperatura óptima para las bacterias y se tiene incubando solo 3 horas, porque el objetivo no es que las bacterias crezcan o se desarrollen mucho, sino ver y comparar en que material se adhieren más. Si se dejan menos de tres horas no da tiempo a que se adhieran y si se las deja más tiempo, la cantidad de bacterias va a ser muy grande y la observación no va a ser buena, como ya se ha indicado anteriormente.

PARTE EXPERIMENTAL

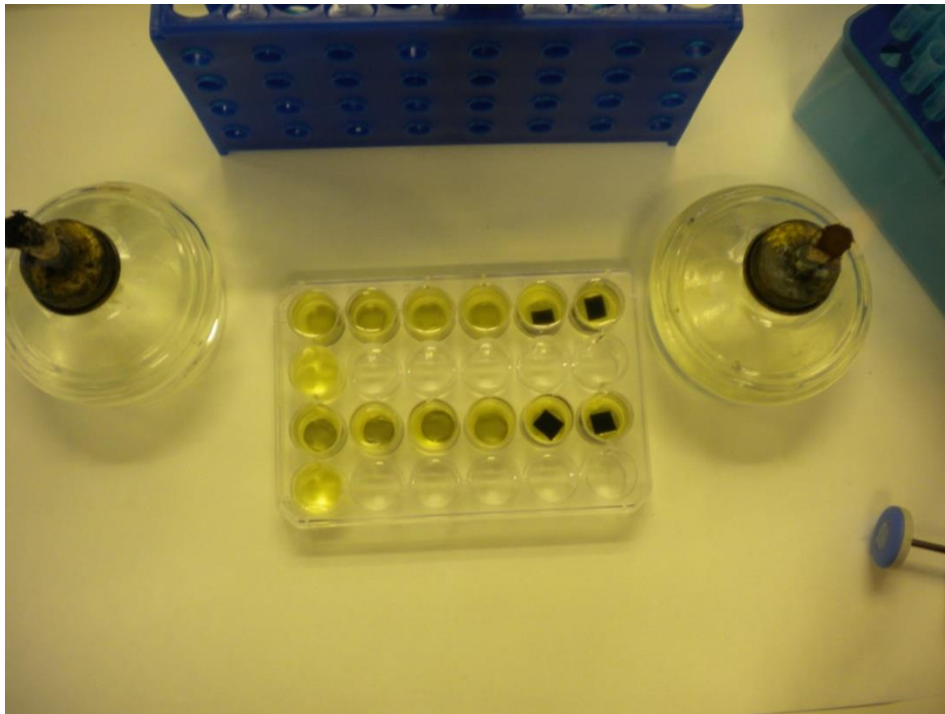


Figura 30.- Bacterias incubando sobre los materiales.

Una vez transcurridas las 3 horas, es necesario aspirar el sobrante del medio y las bacterias que no se han pegado al material. Después se realiza un lavado con suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9%) y se agita suavemente la placa microtitulada, para eliminar del material aquellas bacterias que no se han adherido completamente a la superficie de la muestra. Finalmente, se aspira el suero, obteniéndose los biofilms ya preparados.



Figura 31.- Aspiración del sobrenadante de bacterias.

PARTE EXPERIMENTAL

Una vez conseguidos los biofilms, se realizan dos ensayos diferentes que se explicarán posteriormente:

- Observación de los biofilms por microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Cultivo de bacterias para observación y conteo de colonias.

Después de ver los datos obtenidos en los ensayos, se observa que hay demasiadas colonias de bacterias por lo que se proponen 5 modificaciones para reducir el número de colonias que se llevaron a cabo en el segundo procedimiento:

- Disminución del tiempo de incubación de la disolución stock de partida.
- Realizar una prueba de cultivo con distintas diluciones para seleccionar la más conveniente.
- Disminución del tiempo de incubación de las bacterias sobre los materiales.
- En el proceso de cultivo hacer diluciones seriadas de las bacterias que contenía el material antes de plaquearlas.
- Se disminuye la cantidad de dilución que se pipetea en cada pocillo.

Segundo procedimiento de elaboración de biofilms:

El proceso de preparación de los materiales y el proceso de desinfección y de acondicionamiento de las probetas se realizaron de la misma manera que en el primer protocolo descrito anteriormente. Se mantiene el procedimiento ya que después de observar las muestras al microscopio, no se encontró contaminación, el método es sencillo, eficaz, económico y no daña el material a estudiar.

Para proceder a la preparación de las bacterias se realizó la disolución stock, que se deja incubando 12 horas, en vez de 24 horas como en el primer procedimiento. Se tomó esta medida debido a que en los ensayos se observaron muchas colonias, agrupadas y fue imposible contarlas porque no se encontraban de forma aislada. El resto de parámetros se mantuvieron constantes, temperatura, agitación y proporciones de la disolución stock.

Se realizó una prueba de cultivo con distintas diluciones para seleccionar la más conveniente para los posteriores ensayos.

Partiendo de la disolución stock, se realizaron ocho diluciones diferentes. Se dividieron dos placas AGAR en cuatro partes cada una, y se colocó en cada sección una de las diluciones (Figura 32).

PARTE EXPERIMENTAL

Se dejó incubar la placa en posición invertida a 37 °C durante 24 horas.

Es importante destacar que el cultivo que se realizó en estas dos placas AGAR no tuvo contacto con los materiales que se quieren estudiar, ya que solo se pretendía ver el número de colonias de bacterias en cada dilución para poder elegir la dilución más adecuada.

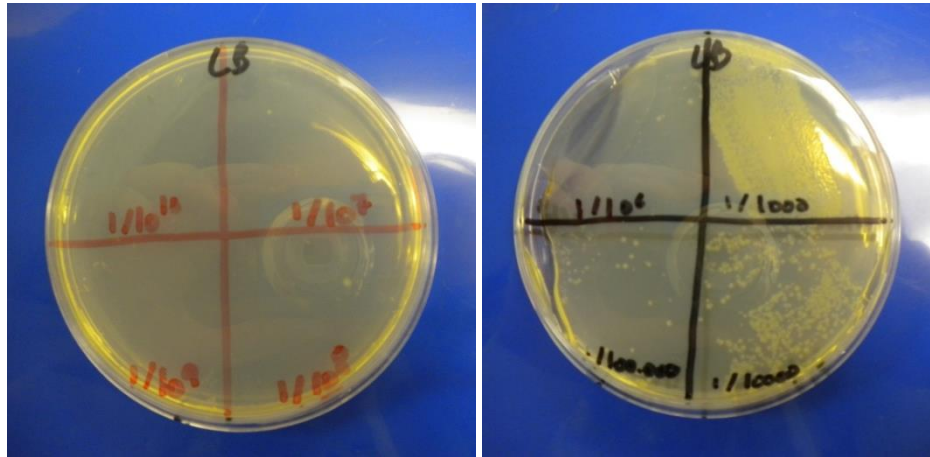


Figura 32.- Prueba de cultivo con las diferentes diluciones.

Lo ideal sería que el cultivo final tenga un aspecto parecido a lo que se observa en la dilución 1/100.000, pero se va a elegir la dilución 1/10.000 porque como este ensayo pretende buscar materiales antibacterianos, es posible que al realizarlo sobre las muestras en cuestión, se consigan menos colonias de las que se ven en esta prueba. Además en el cultivo, cuando se hace el raspado con la torunda, se realiza una nueva dilución, que en esta prueba no se tiene en cuenta.

Al llevar a cabo este ensayo, aunque se haya utilizado un día más, se consigue reducir el número de biofilms y la cantidad de material a ensayar, lo que conlleva una reducción de los recursos empleados.

Como ya se ha analizado previamente un ensayo para ver con que dilución se trabaja, sólo se va utilizar una que será 1/10.000 de la disolución stock, que se había preparado y crecido previamente.

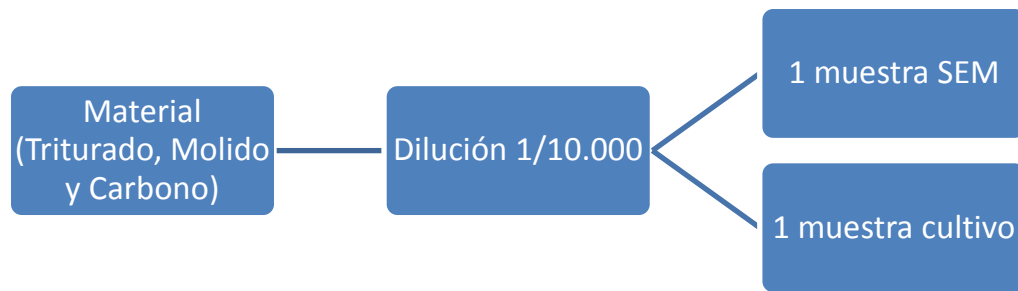


Figura 33.- Esquema segundo procedimiento.

Se va a utilizar un volumen de 1,167 ml en cada pocillo por cada muestra para realizar los biofilms en lugar de los 2 ml que se usaron en el primer procedimiento.

$$3 \text{ materiales} \times 2 \text{ muestras} /_{\text{material}} \times 1,167 \frac{\text{ml}}{\text{muestra}} = 7 \text{ ml dilución } \frac{1}{10.000} \quad (20)$$

Preparación de los 7 ml:

$$\underbrace{\frac{1}{10.000} \text{ bacterias} * 7 \text{ ml}}_{7 * 10^{-4} \text{ ml bacterias}} + \underbrace{\frac{9.999}{10.000} \text{ LB} * 7 \text{ ml}}_{6,9993 \text{ ml LB}} \rightarrow 7 \text{ ml} \left(\text{dilución } \frac{1}{10.000} \right) \quad (21)$$

La colocación de muestras en la placa microtitulada, el posterior pipeteado de la dilución, la aspiración y el lavado con suero fisiológico, se realizaron igual que en el primer procedimiento. El único parámetro que se cambió fue el tiempo de incubación, que en este caso se redujo a 2 horas. Este tiempo se calculó para obtener una superficie menor cubierta por bacterias. Para ello se realizaron una serie de cálculos:

El crecimiento de las bacterias viene dado por una ley exponencial:

$$\text{superficie ocupada por bacterias} = k * e^t \quad (22)$$

Se supuso, que para el primer procedimiento, la superficie de la muestra se llenó completamente de bacterias, por lo que se supuso el 100% (1 en tanto por 1).

PARTE EXPERIMENTAL

$$\text{Para 3 horas} \rightarrow 1 = k * e^3 \quad (23)$$

Como todos los parámetros son conocidos, se puede despejar el valor de la constante k:

$$k = \frac{1}{e^3} \quad (24)$$

Para saber aproximadamente la cantidad de superficie ocupada por bacterias, cuando se reduce una hora el tiempo de incubación, se planteó la ecuación siguiente:

$$\text{Para 2 horas} \rightarrow s = k * e^2 \quad (25)$$

$$s = \frac{1}{e^3} * e^2 = \frac{1}{e} = 0,37 \rightarrow 37\% \text{ superficie ocupada por bacterias} \quad (26)$$

Al reducir en una hora el tiempo de incubación, se conseguiría aproximadamente un descenso del 63% de la superficie cubierta por bacterias, por lo que se podrían contabilizar mejor las colonias que crecieran.

Después de ver los datos obtenidos en los ensayos, se observan en el microscopio cristales de cloruro sódico procedentes del suero fisiológico, que dificultan la observación. Para evitar que aparezcan estos cristales, o por lo menos para disminuirlos, se debería disminuir la concentración de cloruro sódico, el problema es que el suero con esa composición es una solución amortiguadora de pH que es empleada para procedimientos bioquímicos. Es una solución isotónica, no tóxica y no afecta al funcionamiento normal de las bacterias. Si se modifica la composición del suero disminuyendo la cantidad de cloruro sódico, las bacterias podrían estallar por ósmosis.

Si los líquidos extracelulares se diluyen se vuelven hipotónicos respecto de las bacterias y el agua tiende a pasar la membrana semipermeable que poseen las bacterias, de modo que las bacterias se hinchan pudiendo llegar a estallar. Por otra parte si se aumenta la concentración de soluto se volvería hipertónica respecto a las bacterias por lo que estas perderían agua deshidratándose. Por tanto como conclusión se obtiene que la composición del suero no puede variarse.

PARTE EXPERIMENTAL

También se observó en los ensayos que había muy pocas colonias de bacterias por lo que se propusieron 4 modificaciones para conseguir un número de colonias óptimo:

- Se modificó la composición de la disolución stock, introduciendo más bacterias que en los dos procedimientos anteriores y se dejaron incubando durante 24 horas.
- Se utilizó una dilución con mayor cantidad de bacterias que en el procedimiento 2, pero menor que la utilizada en el procedimiento 1, buscando un equilibrio entre ambos.
- Se modificó la cantidad de dilución que se pipetea en cada pocillo, llegando a un compromiso intermedio entre los dos procedimientos realizados hasta ahora.
- Se mantuvo el tiempo de incubación con los materiales para la producción de biofilms que se utilizó en el primer procedimiento.

Tercer procedimiento de elaboración de biofilms:

Se modificó la cantidad de bacterias tanto en la disolución stock, como en la dilución, pero se volvió al tiempo propuesto en el procedimiento primero de incubación de las bacterias con los materiales (3 horas).

Realmente lo que interesa es dejar el tiempo suficiente como para que las bacterias se puedan pegar al material y comprobar que efectivamente es antibacteriano.

El proceso de preparación de los materiales y el proceso de desinfección y de acondicionamiento de las probetas se realizó de la misma manera que en el primer protocolo que se ha descrito. Se mantuvo el procedimiento ya que después de observar las muestras al microscopio, no se encontró contaminación, el método es sencillo, eficaz, económico y no daña el material a estudiar.

Como se ha explicado en el análisis de los resultados del procedimiento 2, se modificó la composición de la disolución stock con respecto a los procedimientos anteriores, en este caso se utilizó la siguiente:

Para obtener 1 ml de la disolución stock:

$$30 \mu\text{l bacterias} + 970 \mu\text{l LB} \rightarrow 1 \text{ ml disolución stock} \quad (27)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Para obtener 3 ml de la disolución stock:

$$\underbrace{90 \mu l \text{ bacterias}}_{30 \mu l \text{ bacterias} \times 3} + \underbrace{2910 \mu l \text{ LB}}_{970 \mu l \text{ LB} \times 3} \rightarrow 3 \text{ ml disolución stock} \quad (28)$$

Una vez preparada la disolución stock, se dejó incubar durante 24 horas a 37°C y en agitación.

Igual que en el procedimiento 2, sólo se va a utilizar una dilución para realizar los biofilms, reduciendo así la cantidad de material a emplear, y por tanto el coste del ensayo.

Se utilizó una dilución, en este caso no se realizó una prueba de cultivo para seleccionar la dilución que se iba a utilizar, sino que se eligió una dilución intermedia entre la utilizada en el procedimiento 1 y en el 2, ya que se busca un resultado intermedio entre los que se han obtenido. Las diluciones que se utilizaron en el primer procedimiento fueron 1/10 y 1/50 y en el segundo 1/10.000, y en este ensayo se seleccionó una dilución 1/100.

Se volvió a ensayar los 3 materiales propuestos, y se prepararon 2 muestras por material, una para el ensayo de cultivo y otra para la observación en el microscopio.

Se utilizó un volumen de 1,25 ml en cada pocillo por cada muestra para realizar los biofilms.



Figura 34.- Esquema tercer procedimiento.

Por lo que el volumen final de dilución que se necesita es:

$$3 \text{ materiales} \times 2 \text{ muestras/material} \times 1,25 \text{ ml/muestra} = 7,5 \text{ ml dilución } \frac{1}{100} \quad (29)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de los 7,5 ml:

$$\underbrace{\frac{1}{100} \text{ bacterias} * 7,5 \text{ ml}}_{0,075 \text{ ml bacterias}} + \underbrace{\frac{99}{100} \text{ LB} * 7,5 \text{ ml}}_{7,425 \text{ ml LB}} \rightarrow 7,5 \text{ ml} \left(\text{dilución} \frac{1}{100} \right) \quad (30)$$

Una vez preparados los 7,5 ml se procede a la elaboración de los biofilms.

Los biofilms se prepararon de igual modo que en el procedimiento número 1, con la salvedad de que en vez de pipetearse 2 ml en cada pocillo se pipetearon 1,25 ml. Por consiguiente las condiciones de temperatura, agitación y tiempo de incubación se mantuvieron.

De nuevo pasadas las 3 horas, se lavaron las muestras con suero fisiológico, y una vez aspirado éste último las muestras ya estaban preparadas con los correspondientes biofilms.

3.3.6.2 Ensayo de cultivo.

Primer procedimiento de cultivo.

Este ensayo es necesario llevarlo a cabo inmediatamente después de que se han realizado los biofilms, para evitar que las bacterias se mueran o cambien su morfología debido a la deshidratación.

Se ha realizado la explicación del proceso para una muestra, pero es igual para el resto de ellas.

Una vez que el biofilm está terminado, sin sacar el material de la placa microtitulada, se cogió una torunda previamente esterilizada, y se pasó únicamente por el material, arrancando todas las bacterias que se habían adherido previamente (Figura 35). Hay que tener especial cuidado de no arrastrar las bacterias que se han quedado en el porta, para cometer el menor error posible por exceso.

PARTE EXPERIMENTAL

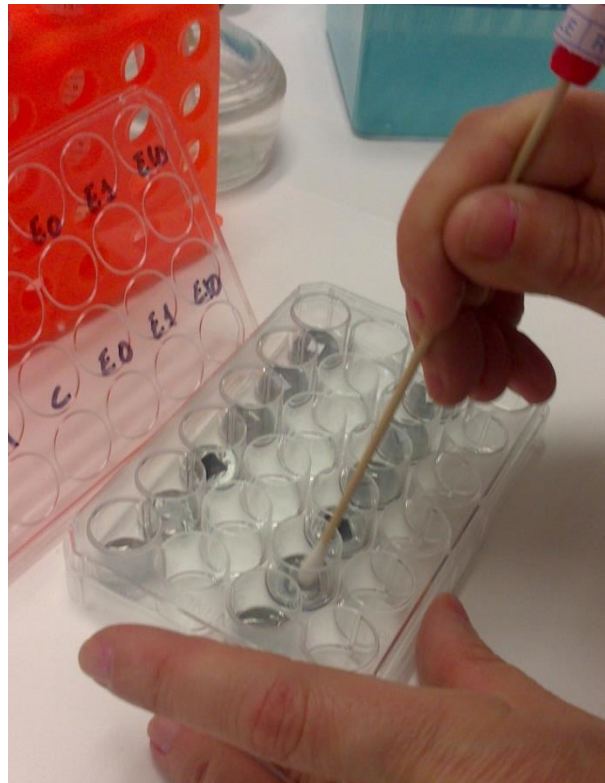


Figura 35.- Arrastre de las bacterias con la torunda.

La torunda impregnada de bacterias (Figura 36) se introdujo en un tubo *falcon* con un 1 ml de LB nuevo y se dejó incubar durante una 1 hora en agitación a 37° para que las bacterias pasaran de la torunda al medio.



Figura 36.- Torunda impregnada de bacterias en tubo de falcom.

PARTE EXPERIMENTAL

Una vez transcurrida la hora, se dividió una placa de AGAR en dos secciones y se distribuyeron 200 μ l de la dilución anterior en una de ellas en forma de zig-zag, utilizando para ello un asa de siembra. En la otra sección, se distribuyeron los restantes 800 μ l de la misma manera.

Realizada la distribución de la dilución en la placa, se dejó incubando a 37 °C durante toda la noche.

Tras la incubación, se observaron las colonias bacterianas sobre la superficie del agar. Cada colonia representa a una unidad formadora de colonia (ufc). Normalmente una ufc se corresponde con una célula viable.

Se seleccionó la sección de la dilución que había producido un número de colonias que se podían contar y se realizó el conteo de las colonias presentes.

El resultado debe expresarse como ufc/ml, para ello se multiplicó el promedio del nº de colonias obtenido por el inverso de la dilución final de la muestra.

Segundo procedimiento de cultivo

Se utilizó la torunda otra vez como en el procedimiento anterior, y ésta se introdujo en un bote falcom con un 1 ml de LB, igual que en el proceso 1. Transcurrida una hora, después de que las bacterias hubieran pasado al medio, se hicieron diluciones seriadas de este mililitro, en lugar de plaquearse directamente en la placa AGAR como en el primer procedimiento de cultivo. Esto se hizo para buscar un número de colonias óptimo para su posterior conteo. Para realizar las diluciones seriadas, se dividió la placa en cuatro secciones y se plaquearon 10 μ L de cada una de las diluciones en una sección. Se plaquearon en primer lugar, sin diluir (dilución de 1/10.000), y luego se hicieron diluciones seriadas de 10 en 10 según se muestra en el siguiente esquema de la Figura 37:



Figura 37.- Esquema de la distribución de las diluciones en la placa de agar en el 2º procedimiento.

PARTE EXPERIMENTAL

Una vez llevado a cabo este procedimiento, se incubó la placa durante 24 horas en posición invertida y a 37 °C. Transcurrido este tiempo se procedió a analizar los resultados obtenidos (Figura 38).

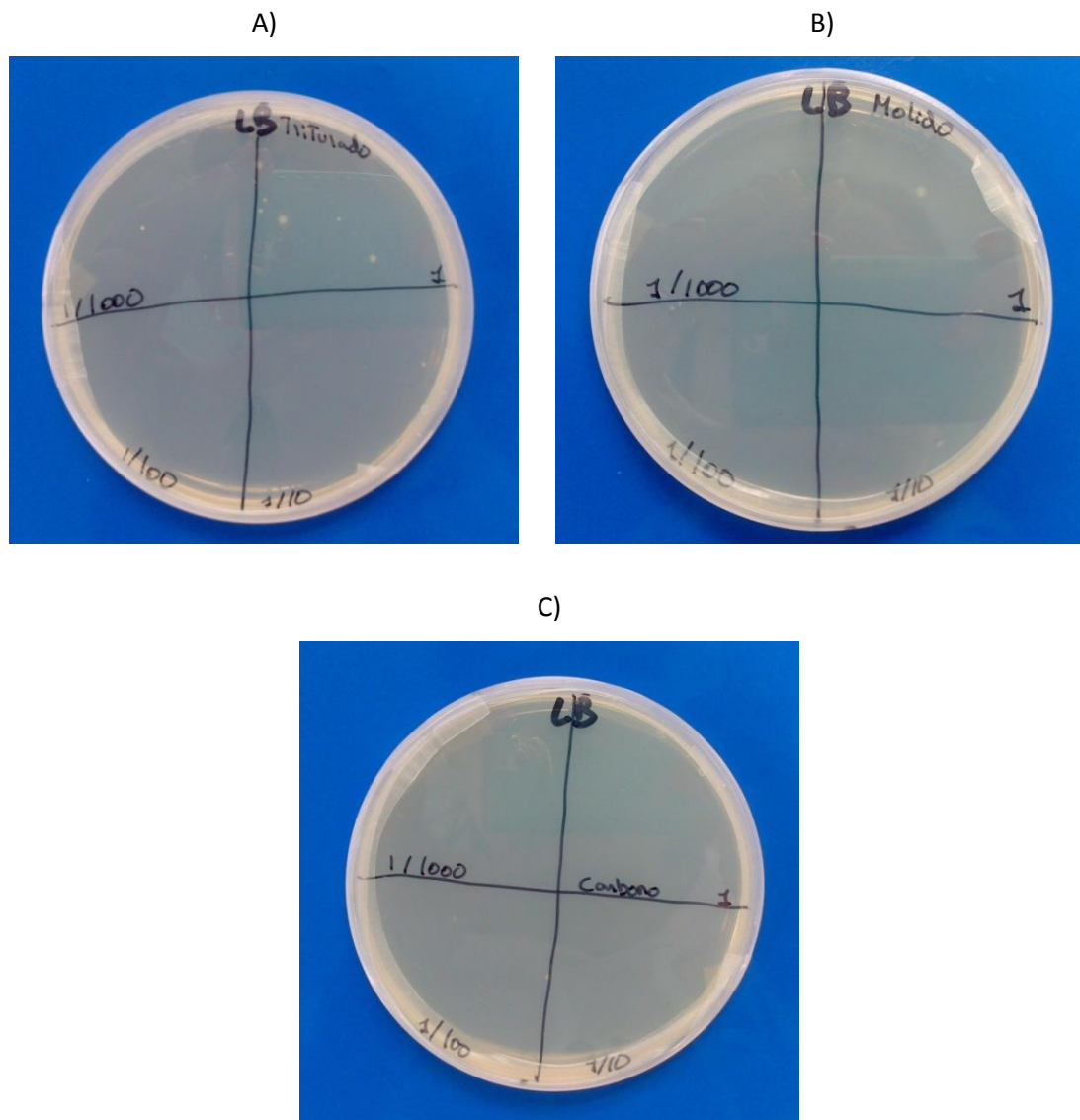


Figura 38.- Resultados del cultivo en el segundo procedimiento A) LDPE Triturado B) LDPE Triturado + Molido
C) LDPE Triturado + Molido + 1%MWCNT

Tercer procedimiento de cultivo.

Por cada material se pasó una torunda tratando de recoger todas las bacterias que se habían adherido a él, y cada torunda se introdujo en un tubo falcom con 1 ml. de LB, y se dejó incubar

PARTE EXPERIMENTAL

una hora a 37 °C para que las bacterias pasen de la torunda al medio. Pasado este tiempo se hicieron diluciones seriadas como en el procedimiento 2.

Se dividió una placa de AGAR en cuatro secciones y en cada una de ellas se distribuyeron 10μL de la dilución, utilizándose el contenido del falcom en la primera sección (dilución 1/100) y en las sucesivas secciones se utilizaron diluciones seriadas de esta primera (1/1000, 1/10.000 y 1/100.000), como se indica en el siguiente esquema (Figura 39):

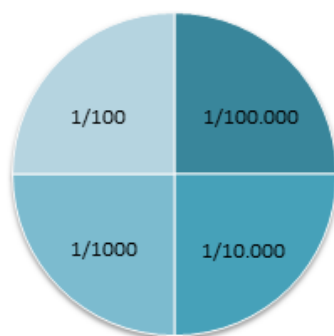


Figura 39.- Esquema de la distribución de las diluciones en la placa agar en el 3^{er} procedimiento de cultivo.

Finalmente se dejó incubar la placa a 37 °C en posición invertida durante toda la noche y transcurrido este tiempo se pudieron observar los resultados.

3.3.6.3 Análisis de imagen por microscopía.

Después de realizar los ensayos de preparación de los biofilms se procedió a su observación a través de un análisis de imagen, utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM).

3.3.7 SEM.

Las probetas que se habían preparado con biofilms, se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM scanning electron microscope), para ver de manera cualitativa como se adhieren las bacterias a los distintos materiales, su distribución espacial, ordenación, si existe y su morfología [33]. En concreto el equipo que se ha utilizado es un PHILLIPS XL30 (Figura 40).

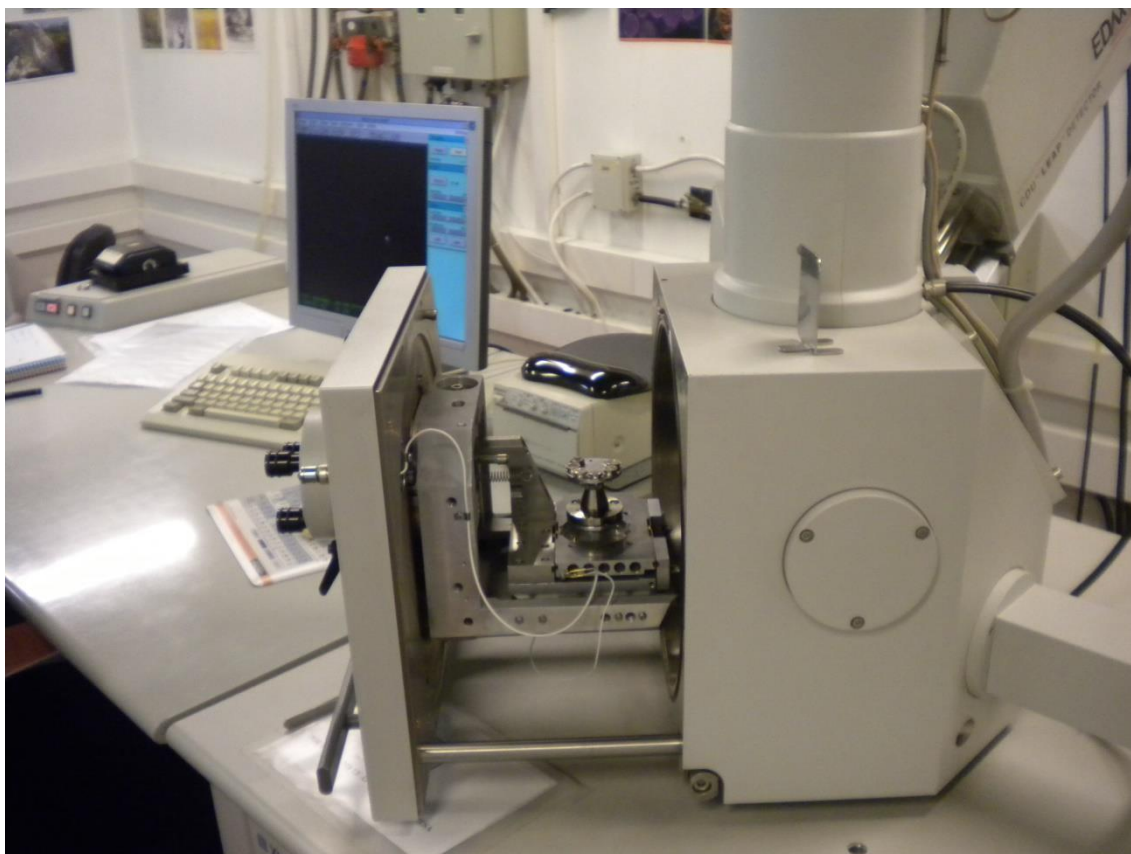


Figura 40.- Microscopio electrónico de barrido Philips XL30

Antes de proceder a la observación, para evitar que las bacterias se desprendan del material o modifiquen su forma debido a la deshidratación, es necesario llevar a cabo un tratamiento de fijado. En este caso se decidió realizar un recubrimiento de oro por deposición anódica.

Se decidió llevar a cabo este tratamiento, porque mantiene la cantidad y morfología de las bacterias. Se valoró utilizar otros métodos, como fijarlas con etanol al 70% en volumen. Pero según la información que se encontró, el etanol alteraba la morfología de las bacterias, por lo que esta técnica se descartó.

Es muy importante recubrir las muestras lo antes posible para mantener todas las propiedades tanto de tamaño, como de morfología y cantidad.

El procedimiento para llevar a cabo el recubrimiento, consistió en coger un porta para el microscopio electrónico y colocar cinta adhesiva de doble cara con carbono para que exista conducción entre el porta y la muestra. Para poder colocar la cinta adhesiva es necesario que el porta de la muestra esté seco. El secado se realizó colocando previamente un papel absorbente debajo de la probeta (nunca se debe tocar la cara de la probeta en la que se

PARTE EXPERIMENTAL

encuentra el biofilm). No se debe secar con aire a presión, ya que puede ser que parte de las bacterias del biofilm se desprendan.

Cuando las probetas están pegadas en los portas, se recubren con oro, utilizando la técnica de deposición anódica, también conocido convencionalmente como recubrimiento por “sputtering”. El tiempo de deposición se fijó en dos minutos, tiempo necesario para conseguir una fina capa de oro sobre el biofilm que fije las bacterias y permita observarlas con claridad con el microscopío.

La máquina de deposición anódica (Figura 41), funciona generando vacío y posteriormente creando una atmósfera con baja presión de argón.

Después, se alimentan los dos electrodos, que posee la máquina, con un potencial alto; éste ioniza los átomos de argón y los lanza de manera que chocan contra el polo positivo que es de oro y debido a este choque, los átomos de oro, precipitan cayendo sobre la probeta, consiguiendo de esta manera su recubrimiento.



Figura 41.- Máquina de deposición anódica para el recubrimiento de las probetas.

Cuando las muestras están recubiertas, se introducen en el microscopío y son analizadas, utilizando voltajes de aceleración de 10, 15 y 20 KV.

PARTE EXPERIMENTAL

Las imágenes que se obtienen en el microscopio, provienen de electrones secundarios (SE) y de electrones retrodispersados (BSE). En el primero de los casos se obtienen imágenes que nos informan exclusivamente de la topografía de las muestras mientras que con los electrones retrodispersados se puede tener información además de la distribución de elementos de diferente masa atómica. Se obtuvieron imágenes a diferentes aumentos 40 x hasta 8000 x para ver diferentes tipos de detalles.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Ensayo de tracción.

El ensayo de tracción, es muy útil para conocer varias propiedades mecánicas del material, por tanto su realización, permite caracterizar el comportamiento mecánico de éste.

Gracias a este ensayo se puede hallar el límite elástico, la tensión máxima, la tensión de rotura, la deformación máxima, el módulo de Young y la tenacidad.

Casi todas las propiedades se obtienen directamente del análisis de curvas de tracción como la que se muestra en la Figura 42.

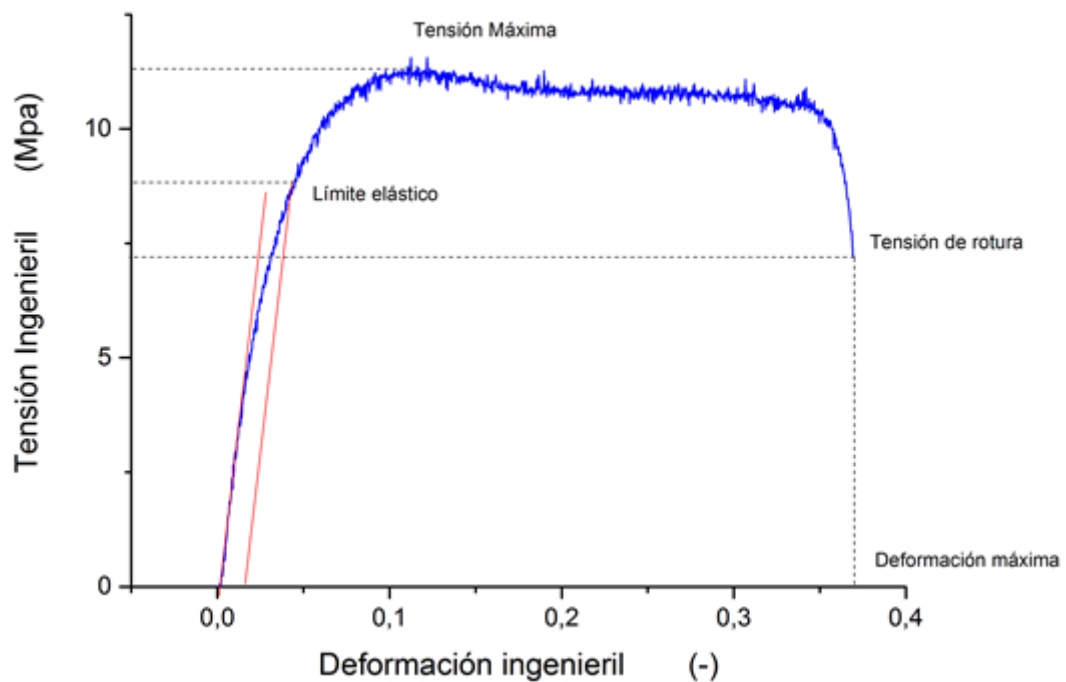


Figura 42.- Gráfica de tensión-deformación con los parámetros importantes.

El límite elástico se calculó utilizando el criterio del 0.02 % y se obtuvo trazando una línea recta paralela a la parte lineal de la gráfica, pasando por el 0.02 % de deformación. El módulo de Young se obtuvo a partir de la pendiente de la zona lineal de la gráfica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, si se calcula el área bajo la curva tensión-deformación se obtiene la tenacidad del material (energía absorbida por el material durante el ensayo hasta su rotura) [34].

El material tiene un comportamiento elástico, esto significa que las deformaciones que en él se producen no son permanentes hasta que se llega al límite elástico, pasado ese valor, gran parte de la deformación es permanente, sólo recupera la deformación correspondiente a la zona elástica.

El comportamiento observado en todos los materiales es típico de polímeros termoplásticos semicristalinos y similar a otros estudios realizados con polietileno [34]. El mecanismo de deformación plástica observado se suele explicar en función de las interacciones de las laminillas cristalinas con las regiones amorfas intermedias, como respuesta a la tensión aplicada. El proceso ocurre en varias etapas que se esquematizan en la Figura 43.

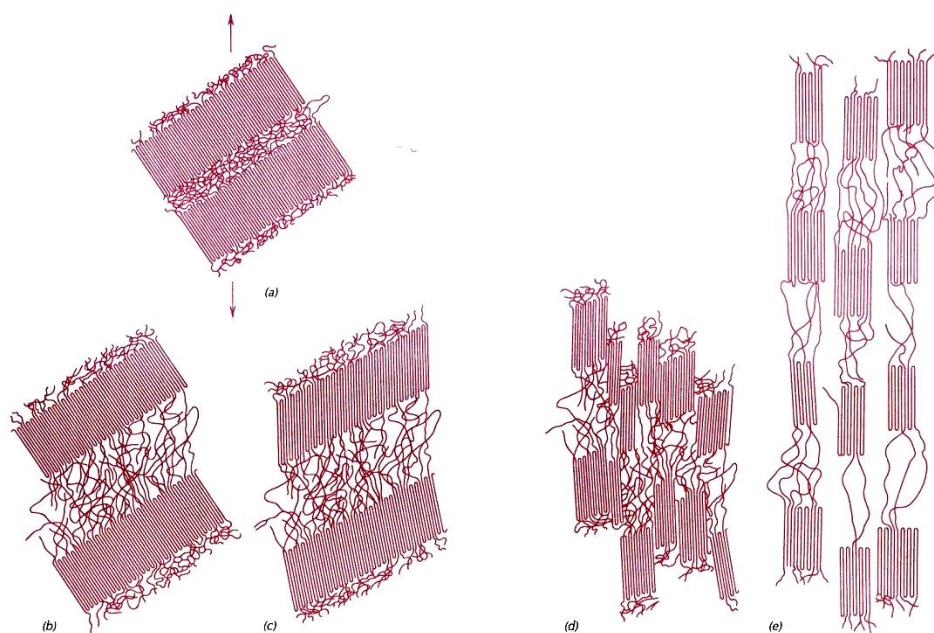


Figura 43.- a) Dos laminillas de cadenas plegadas contiguas y el material amorfo interlaminar antes de la deformación; b) alargamiento de las cadenas del material amorfo durante la primera etapa de la deformación; c) inclinación de las laminillas en la dirección del esfuerzo durante la segunda etapa; d) separación en segmentos de bloques cristalinos durante la tercera etapa; e) alineación de los bloques y de las cadenas de unión en la dirección de la tensión aplicada en la etapa final de deformación. [34]

Por otro lado, la probeta se deforma de manera uniforme hasta que alcanza la tensión máxima, a partir de ese valor comienza a producirse estricción en el cuello de la probeta (Figura 44).

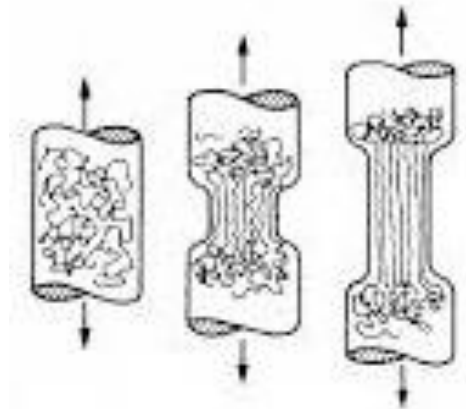


Figura 44.- Aspecto de la probeta debido a la estricción que sufre al ser sometida a tracción.

Macroscópicamente, la descripción de los resultados puede realizarse en los mismos términos que la deformación asociada a un polímero cristalino convencional. En la Figura 45, se muestra una curva típica tensión-deformación de un polímero semicristalino y similar a las curvas obtenidas para los materiales bajo estudio y el perfil de una probeta en varias etapas del proceso de deformación (Figura 44 y 45). Los límites elásticos superior e inferior suelen ser evidentes en las curvas de estos materiales, y después la curva continúa casi paralela al eje de abscisas. Cuando se alcanza el límite elástico superior, en la sección central de la probeta aparece una pequeña estricción, dentro de la cual las cadenas se orientan. Esto hace que la resistencia aumente localmente y, por consiguiente, en ese punto hay mayor oposición a que la deformación continúe. Por tanto, la elongación de la probeta prosigue por propagación de la estricción a lo largo de la zona central. El fenómeno de orientación de las cadenas acompaña a la propagación de la estricción. El hecho de que en estos resultados, la estricción no sea tan evidente (límite elástico inferior menos claro, Figuras 46, 47 y 48), puede ser simplemente debido a que se está trabajando con películas finas por lo que la disminución de tensión por estricción debe ser inferior, ya que el porcentaje de sección que se reduce es menor, al partir de materiales con cadenas preferentemente orientadas en dos direcciones (efecto del prensado en caliente).

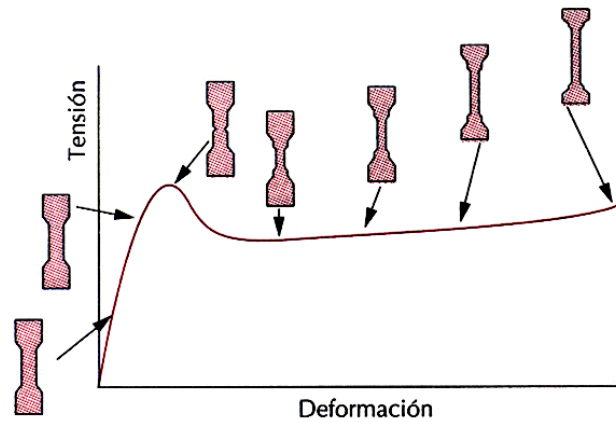


Figura 45.- Deformación macroscópica asociada a curva típica tensión-deformación de un polímero semicristalino.

En las tres gráficas siguientes, se muestran los resultados de los ensayos de tracción de las probetas de los distintos materiales.

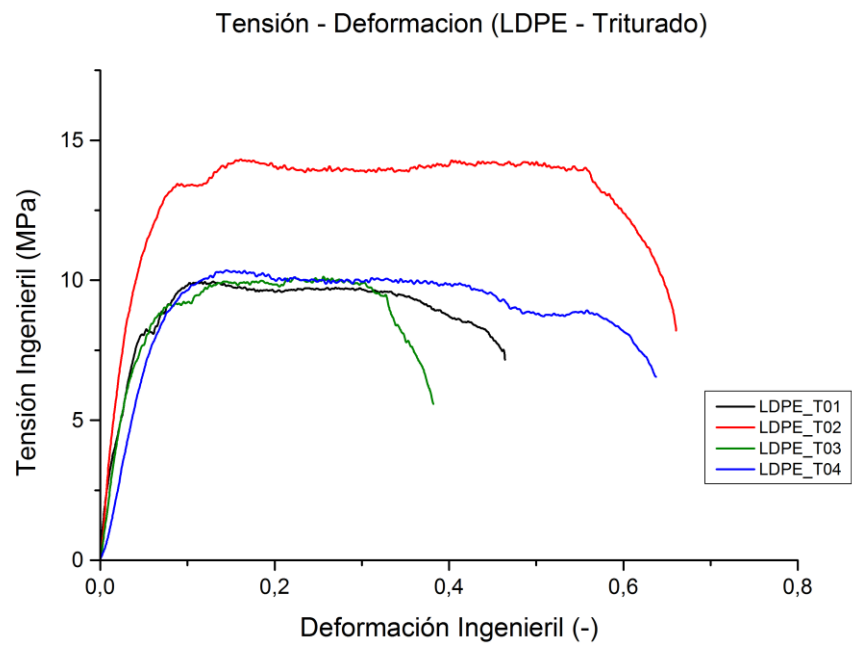


Figura 46.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE triturado.

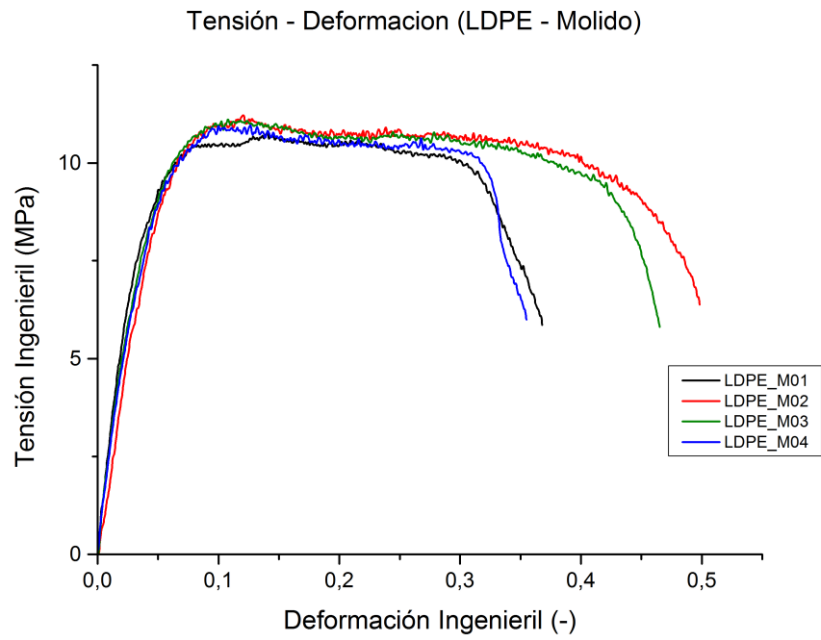


Figura 47.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE molido.

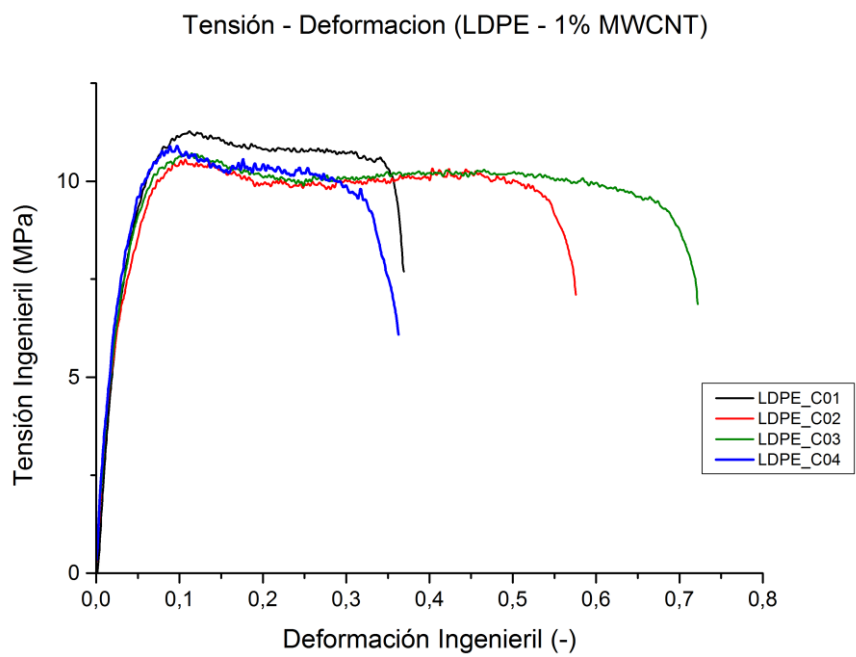


Figura 48.- Curvas de los ensayos de tracción para la muestra LDPE-1% MWCNT.

En las tres gráficas anteriores (Figuras 46, 47 y 48), se muestran los resultados de los ensayos de tracción de las probetas de los distintos materiales.

Como se han ensayado 4 probetas por material, se tienen cuatro curvas en cada material.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede observar, que en la primera gráfica, que corresponde al ensayo de tracción de LDPE solamente triturado, hay una de las curvas que se aleja de las otras tres, está notablemente desplazada hacia arriba, esto puede ser debido a un error en la realización del ensayo en esa probeta en concreto, muy posiblemente en el momento de sujetarla con las mordazas de la máquina.

A continuación, se detalla el valor medio y la desviación estándar de cada una de las propiedades que se han calculado con el ensayo de tracción.

Área bajo la curva [MPa]			Tensión Máxima [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar		Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	5,43	2,32	Triturado	11,54	2,21
Molido	5,01	1,62	Molido	11,36	0,24
Carbono	4,91	1,67	Carbono	11,22	0,30

Límite Elástico [MPa]			Módulo Young [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar		Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	9,38	1,58	Triturado	230,07	71,42
Molido	9,75	0,48	Molido	232,42	12,31
Carbono	9,21	0,65	Carbono	298,71	16,51

Deformación Máxima [-]			Tensión Rotura [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar		Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	0,53	0,13	Triturado	6,87	1,09
Molido	0,52	0,15	Molido	6,01	0,25
Carbono	0,51	0,17	Carbono	6,93	0,66

Tabla 3.- Valores de las propiedades de los materiales y sus correspondientes desviaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para tener una mejor visualización de los datos, se muestran las siguientes gráficas:

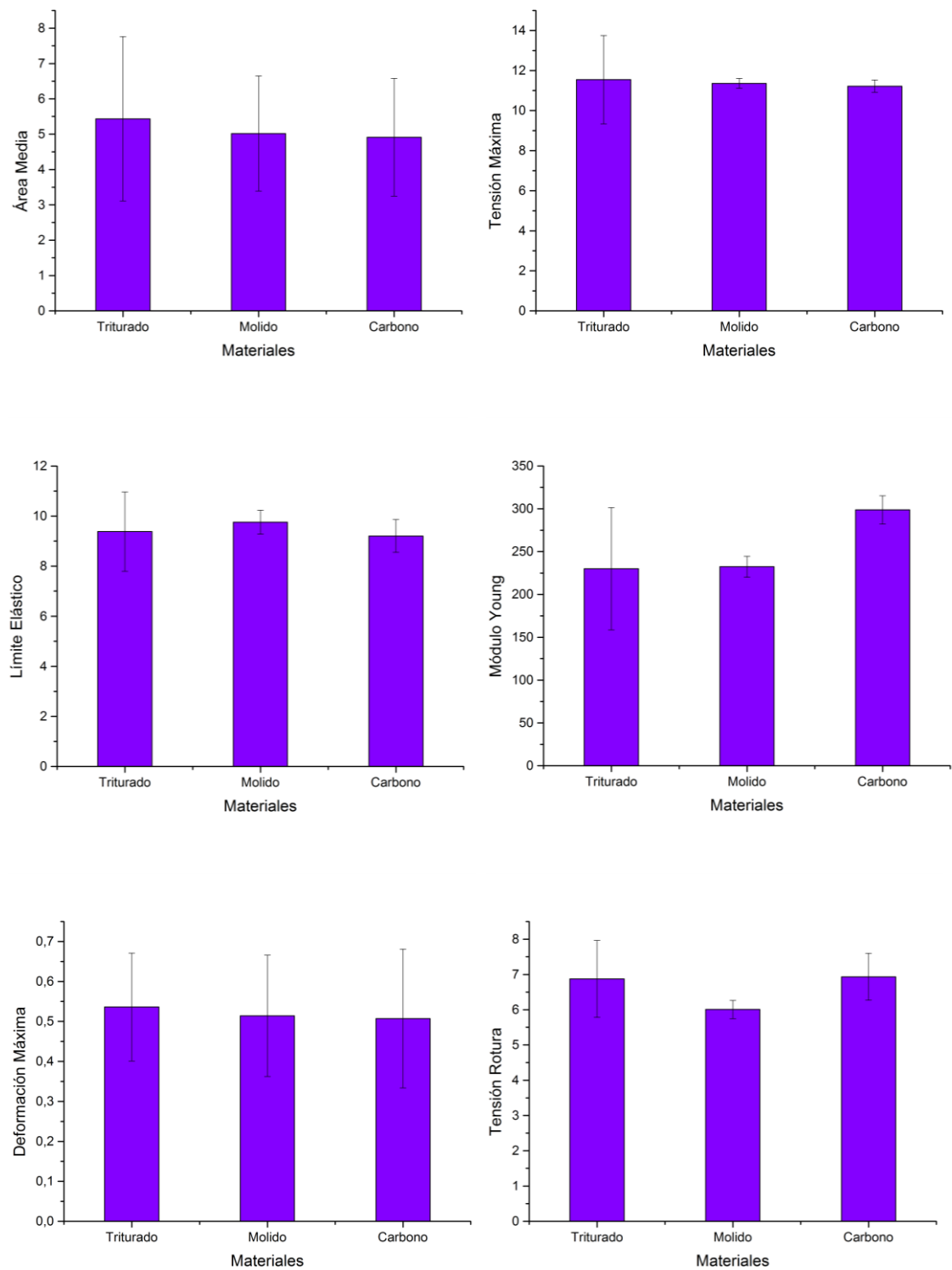


Figura 49.- Gráficas con la comparación de los valores de las propiedades y sus desviaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de ver los valores con su respectivas desviaciones estándar, se observó que la desviación para el primer material, (LDPE triturado) era bastante grande, por lo que se decidió quitar de la primera gráfica, la curva que estaba desplazada hacia arriba (LDPE_T02,) buscando no cometer tanto error en el valor de las propiedades de este material.

A continuación, se muestra la gráfica modificada, sin incluir el valor de LDPE_T02 (Figura 50).

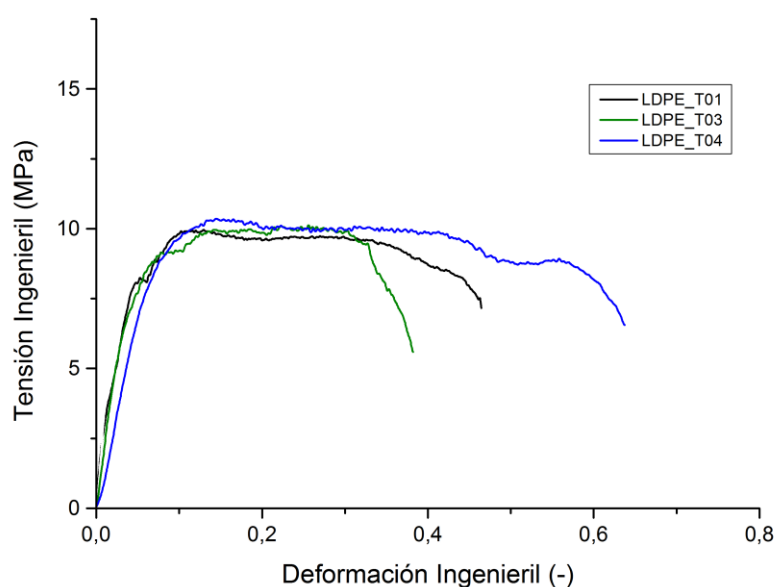


Figura 50.- Gráfica tensión deformación sin LDPE_T02.

Se muestran las tablas con los valores de las propiedades con sus respectivas desviaciones, sin tener en cuenta el valor de LDPE_T02 en los cálculos.

Área bajo la curva [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	4,38	1,20
Molido	5,01	1,62
Carbono	4,91	1,67

Tensión Máxima [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	10,44	0,24
Molido	11,36	0,24
Carbono	11,22	0,30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Límite Elástico [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	8,63	0,65
Molido	9,75	0,48
Carbono	9,2	0,65

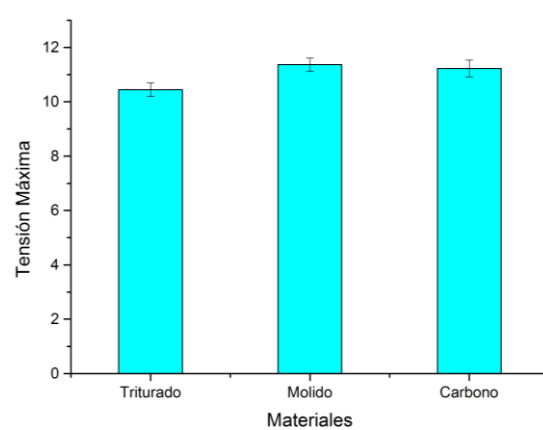
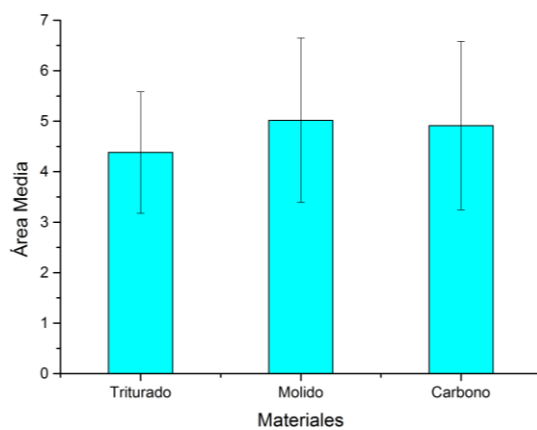
Módulo Young [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	200,55	49,24
Molido	232,42	12,3
Carbono	298,71	16,5

Deformación Máxima [-]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	0,49	0,13
Molido	0,51	0,15
Carbono	0,50	0,17

Tensión Rotura [MPa]		
	Valor Medio	Desviación Estándar
Triturado	6,43	0,79
Molido	6,01	0,25
Carbono	6,93	0,66

Tabla 4.- Valores de las propiedades de los materiales y sus correspondientes desviaciones sin LDPE_T02.

Y de nuevo, para tener una mejor visualización de los datos, se representan gráficamente.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

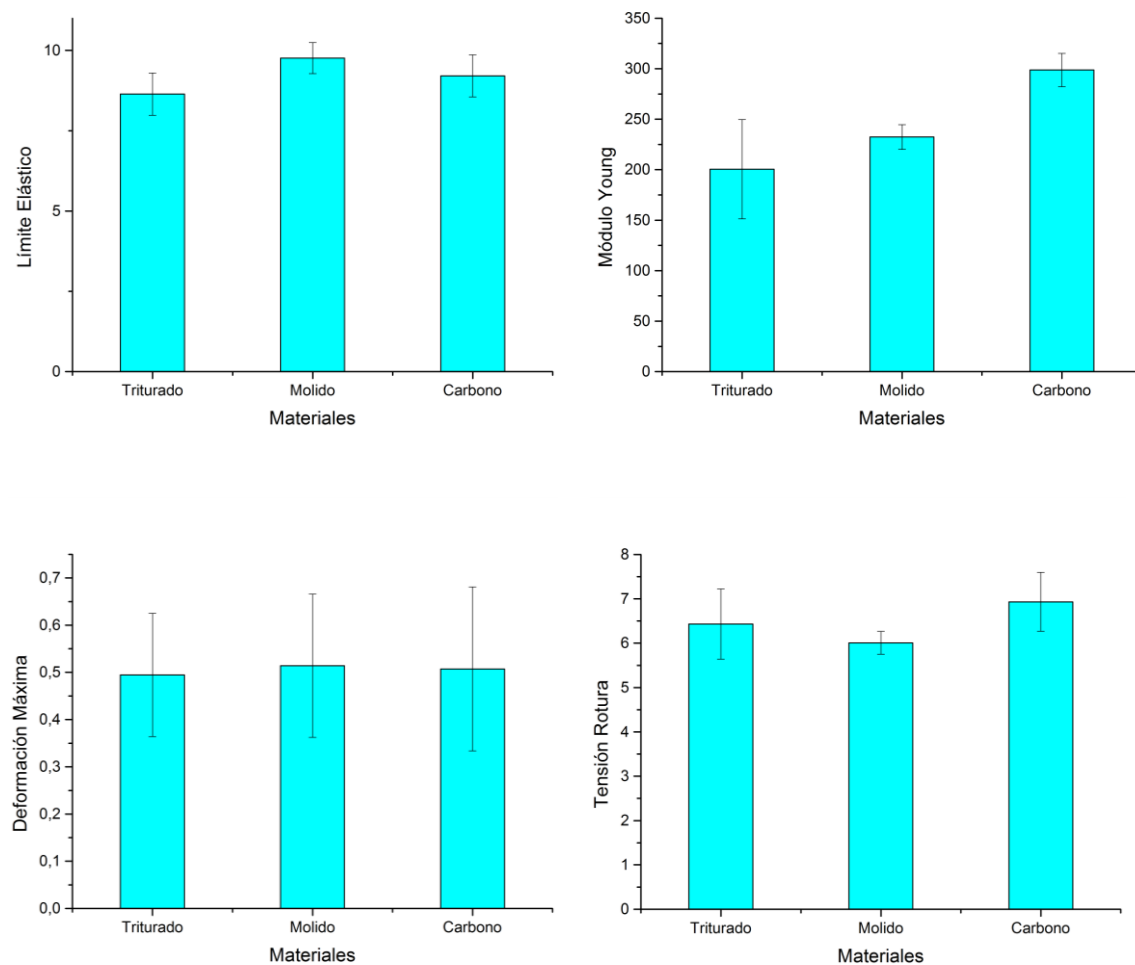


Figura 51.- Gráficas con la comparación de los valores de las propiedades y sus desviaciones sin LDPE_T02.

Se puede ver, que disminuye en varios parámetros el error cometido respecto a cuándo se incluía en la gráfica, la curva de LDPE_T02, por lo que se van a comentar estos últimos resultados.

De la observación de la tabla y de las gráficas donde se representa el valor de las propiedades mecánicas estudiadas, se puede obtener lo siguiente:

Las propiedades mecánicas del LDPE varían tanto cuando existe una molienda criogénica, como cuando se le incorporan nanotubos de carbono.

El límite elástico aumenta con respecto al LDPE de partida, tanto con la molienda como con la incorporación de nanotubos. Los nanotubos actúan produciendo un efecto reforzante, existiendo una transferencia de carga entre ellos y la matriz polimérica, con lo que se consigue un incremento en el límite elástico.

Tanto la tensión máxima, como el área bajo la curva, y con ello la tenacidad del polietileno, aumentan con el proceso de molienda criogénica y con la inserción de los nanotubos de carbono

La tensión de rotura disminuye con la molienda y aumenta con la inserción de MWCNT, al menos con el porcentaje en peso estudiado.

El módulo de Young se incrementa según se aumenta el procesado, pero sobre todo aumenta cuando se introduce el refuerzo de MWCNT en la matriz de LDPE. Esto es, que el módulo de Young menor pertenece al LDPE solo triturado, y el material con un 1% de MWCNT posee el mayor módulo dentro de los materiales estudiados.

En el material molido, el incremento del módulo de Young se produce debido a un endurecimiento por deformación y en el material compuesto y molido, se consigue un aumento mayor al producirse también, un endurecimiento por el efecto reforzante de MWCNT.

En cuanto a la deformación máxima de los materiales, los tres tienen un valor muy próximo. Además, la desviación de los datos es bastante grande, por lo que no se puede obtener una conclusión buena. Por las propiedades de los materiales estudiados se debería observar que la deformación máxima disminuyera ligeramente primero con la molienda y un poco más con la adición de nanotubos lo cual se podría justificar porque los nanotubos de carbono, restringen el movimiento de las moléculas, disminuyendo la capacidad de deformarse.

Por último, si se comparan los dos materiales que han sido molidos, con el material que solo ha sido triturado, se observa que en los dos primeros, las propiedades han sido mejoradas. Por lo que tanto la molienda criogénica, como los nanotubos de carbono, tiene efectos beneficiosos en las propiedades del LDPE, aportando cada técnica unas mejoras diferentes sobre las propiedades del material base.

4.2 Calorimetría diferencia por barrido (DSC).

En la Figuras 52, 53 y 54, se representan los termogramas asociados a los tres materiales bajo estudio, correspondientes al primer calentamiento, primer enfriamiento y segundo calentamiento respectivamente.

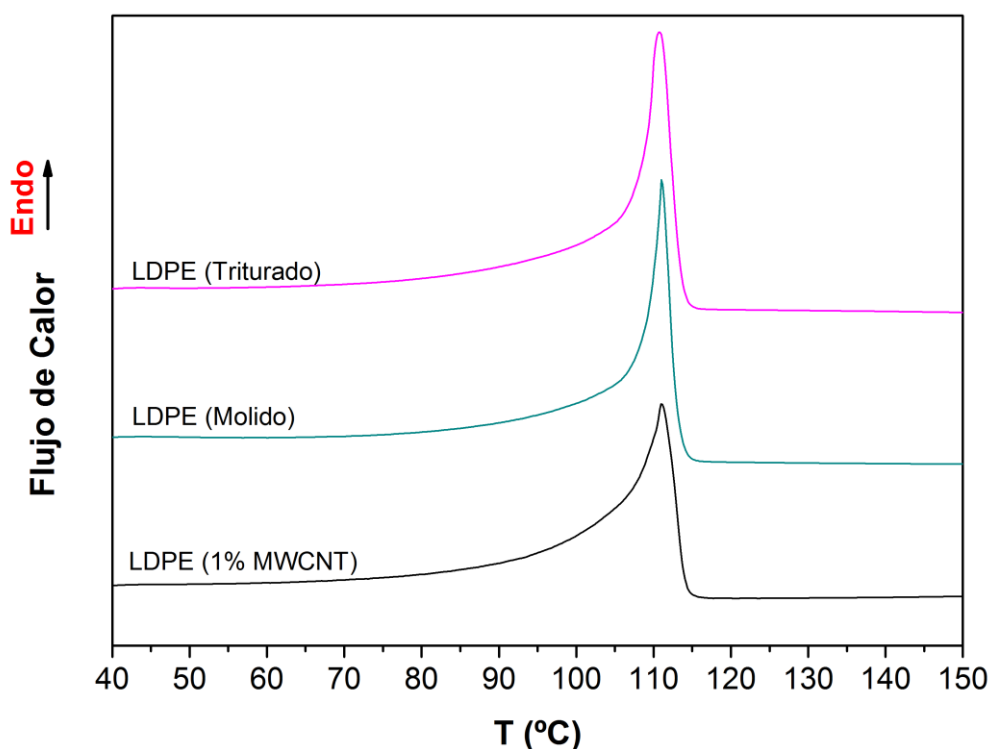


Figura 52.- Termogramas obtenidos a partir del primer calentamiento de los tres materiales bajo estudio.

En la gráfica del primer calentamiento (Figura 52), se puede observar cómo los tres materiales tienen un comportamiento similar, mostrando un único pico endotérmico correspondiente a la fusión del polietileno. El valor de temperatura del pico es en los tres casos aproximadamente el mismo y se suele asociar a la temperatura de fusión (temperatura en la que la velocidad del proceso de fusión es máxima).

Se puede apreciar que el pico del LDPE molido frente al LDPE triturado, (que se va a usar como referencia), es ligeramente más estrecho y puntiagudo. Por otro lado, en el material compuesto con 1% de MWCNT se observa que el pico es ligeramente más corto y la rampa de fusión izquierda es más tendida que en las dos anteriores, dando al pico un grosor mayor en la parte de abajo. Esta anchura suele estar relacionada con la heterogeneidad de los cristales (perfección y tamaño).

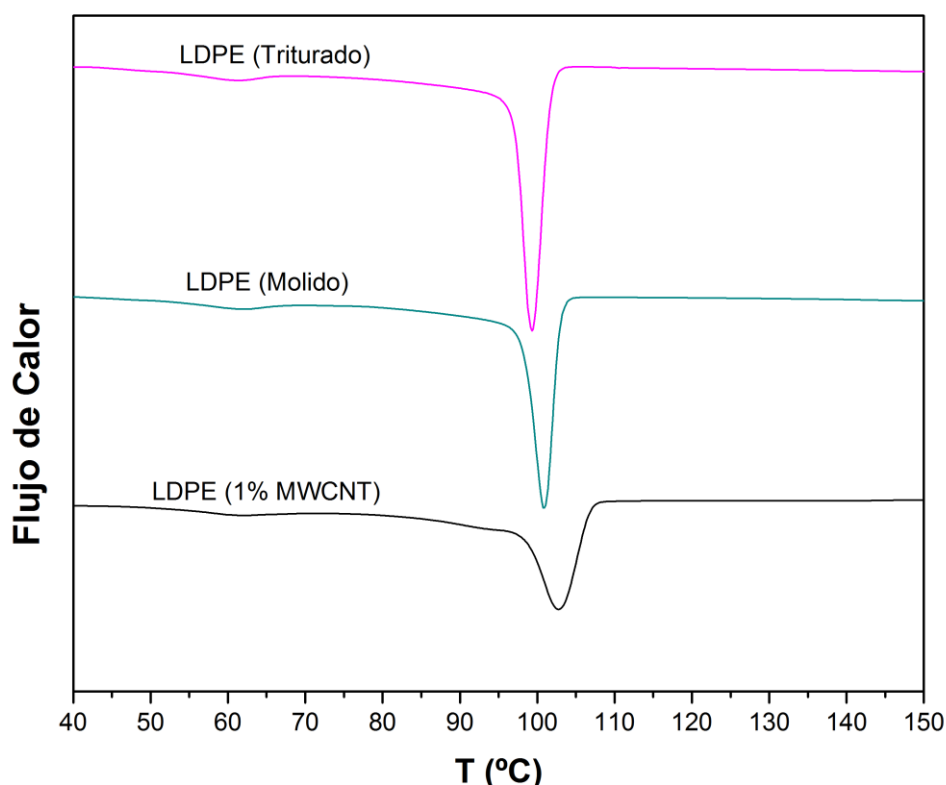


Figura 53.- Termogramas obtenidos a partir del primer enfriamiento de los tres materiales bajo estudio.

En el proceso de enfriamiento (Figura 53), se observan más diferencias entre los materiales que en los procesos de calentamiento.

La gráfica de enfriamiento del LDPE triturado y la del LDPE triturado y molido son similares, solamente se aprecia que la del primer material, el pico de cristalización es un poco más alargado; pero no existen diferencias significativas, ni siquiera en el valor de la temperatura de cristalización, que es la que se asocia al pico exotérmico.

Por otro lado, si se comparan las dos curvas anteriores con la de LDPE con 1% de MWCNT, se aprecian diferencias tales como que el pico exotérmico es más ancho y redondeado y además el valor del máximo aparece ligeramente desplazado hacia mayores temperaturas. Lo anterior, suele asociarse a procesos de nucleación, por lo que se podría decir que la presencia de MWCNT ejerce un efecto nucleante, que hace que el proceso de cristalización se adelante.

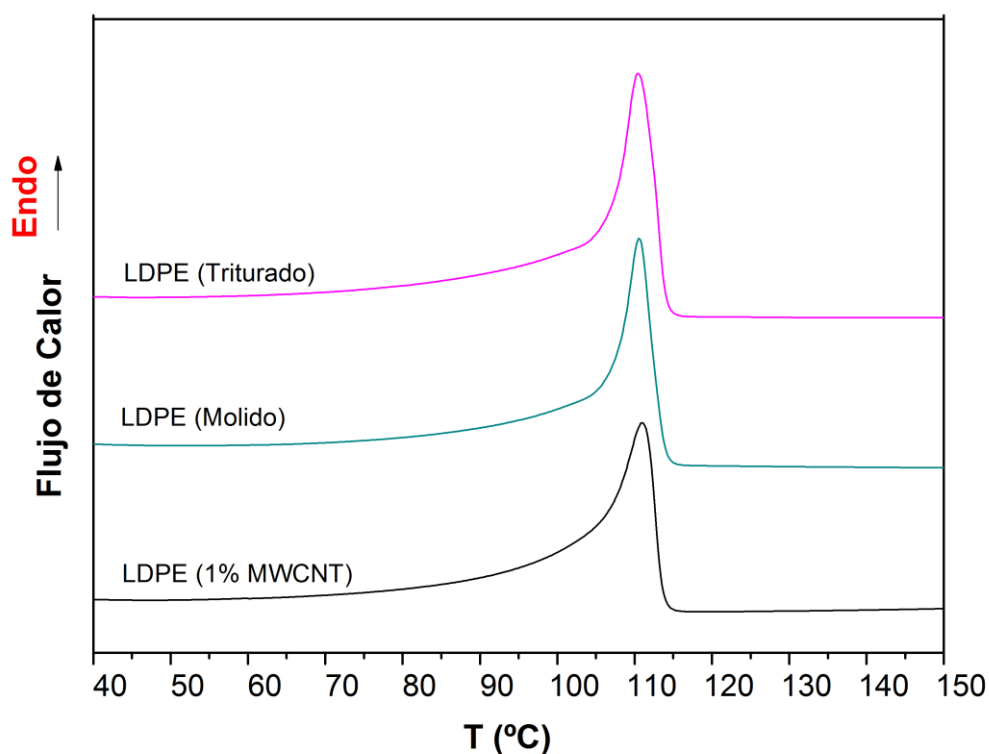


Figura 54.- Termogramas obtenidos a partir del segundo calentamiento de los tres materiales bajo estudio.

En el segundo calentamiento (Figura 54), después de haber realizado el borrado de la historia térmica de los materiales, apenas hay diferencias visibles entre los tres materiales; lo más destacable es que el pico endotérmico del material compuesto con refuerzo de MWCNT vuelve a ser ligeramente más ancho.

A continuación, se muestra la Tabla 5 donde se resumen las temperaturas de fusión y cristalización de los distintos materiales ensayados.

Temperatura [°C]			
	1ª fusión	Cristalización	2ª fusión
LDPE Triturado	110,8	99,3	110,5
LDPE Molido	111,0	100,9	110,5
LDPE + 1% MWCNT	111,0	102,7	111,0

Tabla 5.- Temperaturas de fusión y cristalización de los materiales bajo estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se aprecian diferencias significativas entre las temperaturas de fusión de los distintos materiales en el primer calentamiento.

En el segundo calentamiento, después de haber realizado el borrado de la historia térmica de los materiales, no se observan diferencias significativas entre las temperaturas de fusión de los materiales ni tampoco hay diferencias con respecto a los valores que se han obtenido en el primer calentamiento.

A continuación se muestra la Tabla 6 donde se resumen las entalpías de fusión y cristalización de los distintos materiales ensayados.

Entalpías [J/g]			
	1ª fusión	Cristalización	2ª fusión
LDPE Triturado	130,1	99,0	129,8
LDPE Molido	114,6	87,5	114,5
LDPE + 1% MWCNT	119,0	82,3	116,9

Tabla 6.- Entalpías de fusión y cristalización de los materiales bajo estudio.

La entalpía se define como la cantidad de energía que un sistema intercambia con su entorno a presión constante. Por tanto, la entalpía de fusión indica la cantidad de calor absorbido a presión constante necesario para fundir los cristales de LDPE. Mientras que la de cristalización será la energía liberada en forma de calor a presión constante al cristalizar el LDPE. Gracias a que la entalpía es una propiedad extensiva, se puede estimar el grado de cristalinidad de la matriz de LDPE.

Observando la tabla de entalpías, se puede ver que los valores obtenidos en el LDPE triturado, son mayores que los obtenidos para el LDPE molido y el LDPE molido con 1% en peso de MWCNT. Por tanto, parece que el proceso de molienda, es la causa principal por la cual el LDPE cambia su grado de cristalinidad reduciéndose, o en otras palabras; amorfizando el material. Este resultado se debe destacar, pues puede ser la causa de muchos cambios en las propiedades finales de este tipo de materiales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestra la Tabla 7, donde se presentan los valores de la fracción cristalina, determinada a partir de la Ecuación 6 en los distintos materiales.

Grado de Cristalinidad [-]			
	1ª fusión	Cristalización	2ª fusión
LDPE Triturado	0,45	0,34	0,45
LDPE Molido	0,40	0,30	0,39
LDPE + 1% MWCNT	0,41	0,29	0,41

Tabla 7.- Valores de la cristalinidad de fusión y cristalización de los distintos materiales en tanto por uno.

Los datos de la cristalinidad del material siguen la misma tendencia que los que se obtenían en el análisis de la entalpía, es decir, el LDPE triturado presenta mayor fracción de cristales. Por otro lado, la adición de tan sólo un 1% en peso de MWCNT no parece afectar mucho al grado de cristalinidad. Esto puede indicar que cualquier variación en las propiedades entre estos dos materiales podría ser debido a la propia presencia de nanotubos, más que a variaciones sufridas en la estructura o morfología de la matriz polimérica.

4.3 Análisis termogravimétrico (TGA).

En este ensayo se ha estudiado el proceso de degradación térmica de cada material. Se estudiara como afecta el proceso de molienda y la adición de un 1% de MWCNT al LDPE.

En la Figura 55, se muestran las representaciones asociadas a los análisis termogravimétricos, es decir, la masa de los materiales en función de la temperatura en un experimento dinámico para una rampa de temperaturas de 10 °C/min.

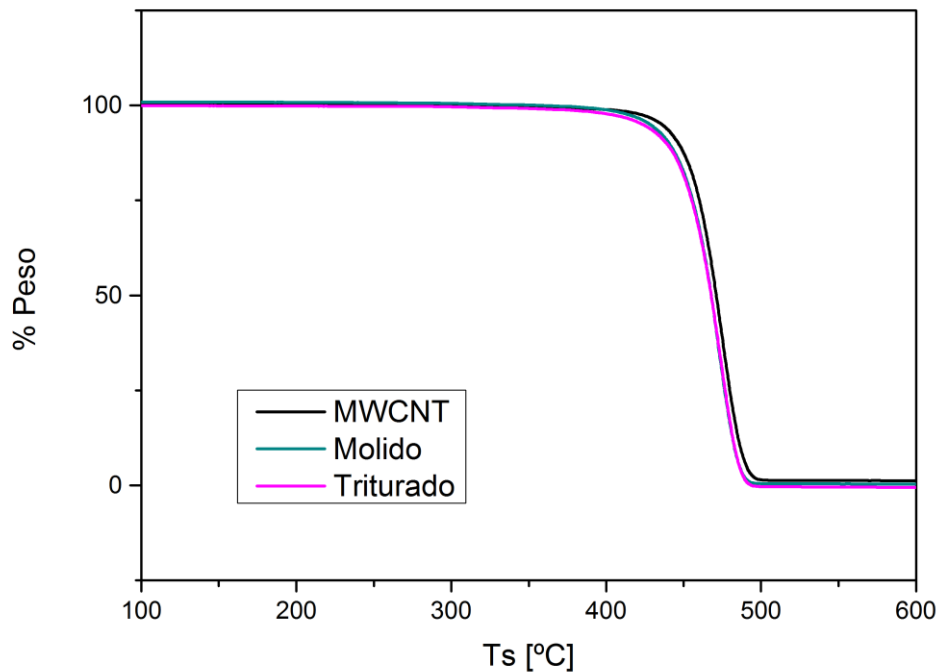


Figura 55.- Curvas de análisis termogravimétrico de los materiales bajo estudio.

El porcentaje de pérdida de masa, se obtiene de dividir la masa inicial de la muestra de material, entre la masa que tiene en cada instante al ir aumentando la temperatura (Ecuación 29):

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{peso instantaneo de la muestra (gr)}}{\text{peso inicial de la muestra (gr)}} \quad (29)$$

Como se puede observar, no se aprecian diferencias destacables entre los tres materiales ensayados (Figura 60). Lo único que podría destacarse es que en el escalón correspondiente a la descomposición de los materiales, se observa que el material compuesto de LDPE con 1% de MWCNT está ligeramente desplazado a la derecha, lo que indicaría un ligerísimo aumento de la temperatura para la cual la velocidad de degradación térmica es máxima. Con objeto de visualizar mejor dicha temperatura se suele emplear el termograma diferencial (Figura 56).

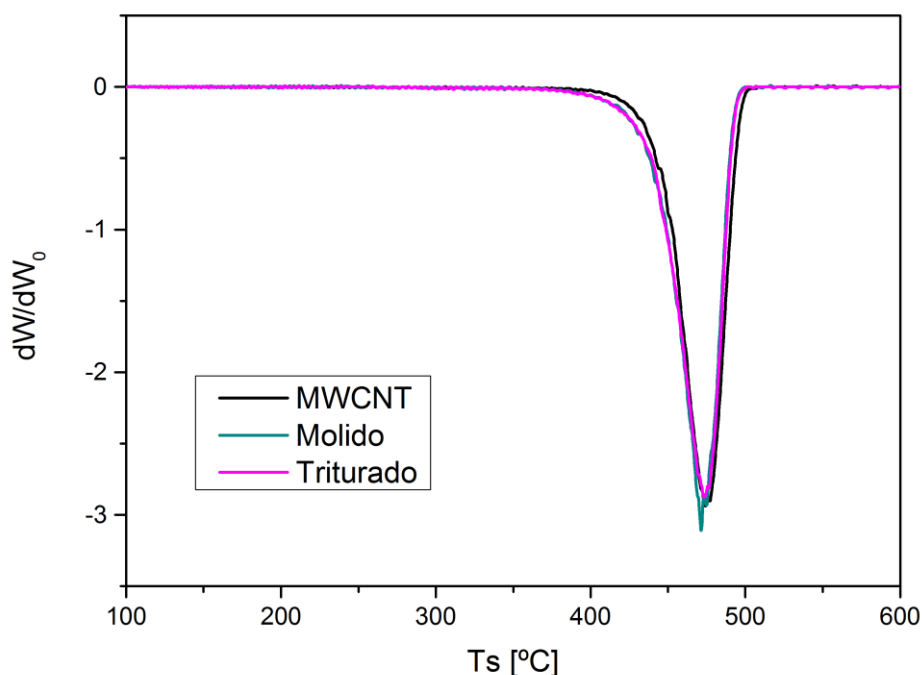


Figura 56.- Termogramas diferenciales asociados a todos los materiales bajo estudio.

Apenas se aprecian diferencias significativas entre los tres materiales estudiados mediante termogravimetría, pero lo que sí se puede observar es que el LDPE molido, tiene un pico más marcado que los otros dos materiales estudiados y éste se encuentra a una temperatura un poco inferior unos 471 °C frente a los 474 °C del LDPE triturado y los 475 °C del LDPE con 1% de MWCNT.

Por otro lado la curva obtenida a partir del termograma diferencial del material compuesto de LDPE con 1% MWCNT, se ve ligeramente desplazada hacia la derecha en la línea base de la gráfica con respecto de las otras dos, sin embargo, el pico está a la misma temperatura aproximadamente que el LDPE triturado, como se ha comentado en el párrafo anterior. Por tanto, se puede concluir que ni la molienda criogénica, ni la incorporación de un 1% de MWCNT, mediante molienda, afecta al proceso de degradación térmica del LDPE. En principio, esto induce a pensar que no existe ningún cambio estructural en el polímero debido fundamentalmente a procesos de oxidación o ruptura de enlaces por activación mecánica promovida por la HEBM. En todo caso, si hubiera alguna modificación importante en la estructura del LDPE debería observarse en los espectros de absorción infrarroja.

4.4 Energía superficial y ángulo de contacto.

En el ensayo de mojabilidad, para conseguir hallar la energía superficial se necesita estudiar el comportamiento de al menos dos líquidos, sobre el material pero se van a utilizar tres para conseguir más precisión.

La tensión superficial tiene dos componentes, polar y dispersiva y el valor de éstas, depende del líquido que se utilice en cada momento. Algunos de ellos tienen una componente polar muy alta y apenas tienen contribución en la componente dispersiva y otros al revés. También hay materiales que tienen ambas componentes con valores muy cercanos.

Es importante que en el ensayo se utilicen líquidos que representen las distintas posibilidades, para conseguir un valor de tensión superficial más fiable.

En este caso, se ha decidido utilizar agua, con una componente polar mayor que dispersiva, diyodometano, que tiene solo componente dispersiva y glicerol, que tiene sus componentes polar y dispersiva más igualada.

4.4.1 Determinación de la mojabilidad.

Esta propiedad se va a determinar midiendo el ángulo de contacto entre la superficie de los materiales en estudio y una gota de líquido.

Se estudia la mojabilidad que tienen los materiales para saber cómo influye en ella, la realización de una molienda criogénica y la incorporación de nanotubos de carbono al material de partida (LDPE). Es decir, ¿el proceso de molienda o la presencia de MWCNT modifican la superficie de los materiales? Solo existen dos maneras de cambiar las propiedades superficiales de la matriz de LDPE, o bien por degradación generando grupos más o menos polares orientados hacia la superficie del material, o bien cambiando la estructura o morfología cristalina en la superficie del LDPE. Ya se ha comprobado que la molienda da lugar a cambios en el grado de cristalinidad, mientras que la presencia de nanotubos produce que los cristales formados sean más heterogéneos.

Como se ha indicado, se han utilizado tres líquidos para el estudio (agua, glicerol y diyodometano) y se ha medido el ángulo de contacto de los tres líquidos con los tres materiales. En la Figura 57 se muestran las imágenes de tres gotas, para ver el ángulo que forman los distintos líquidos empleados con el LDPE molido.

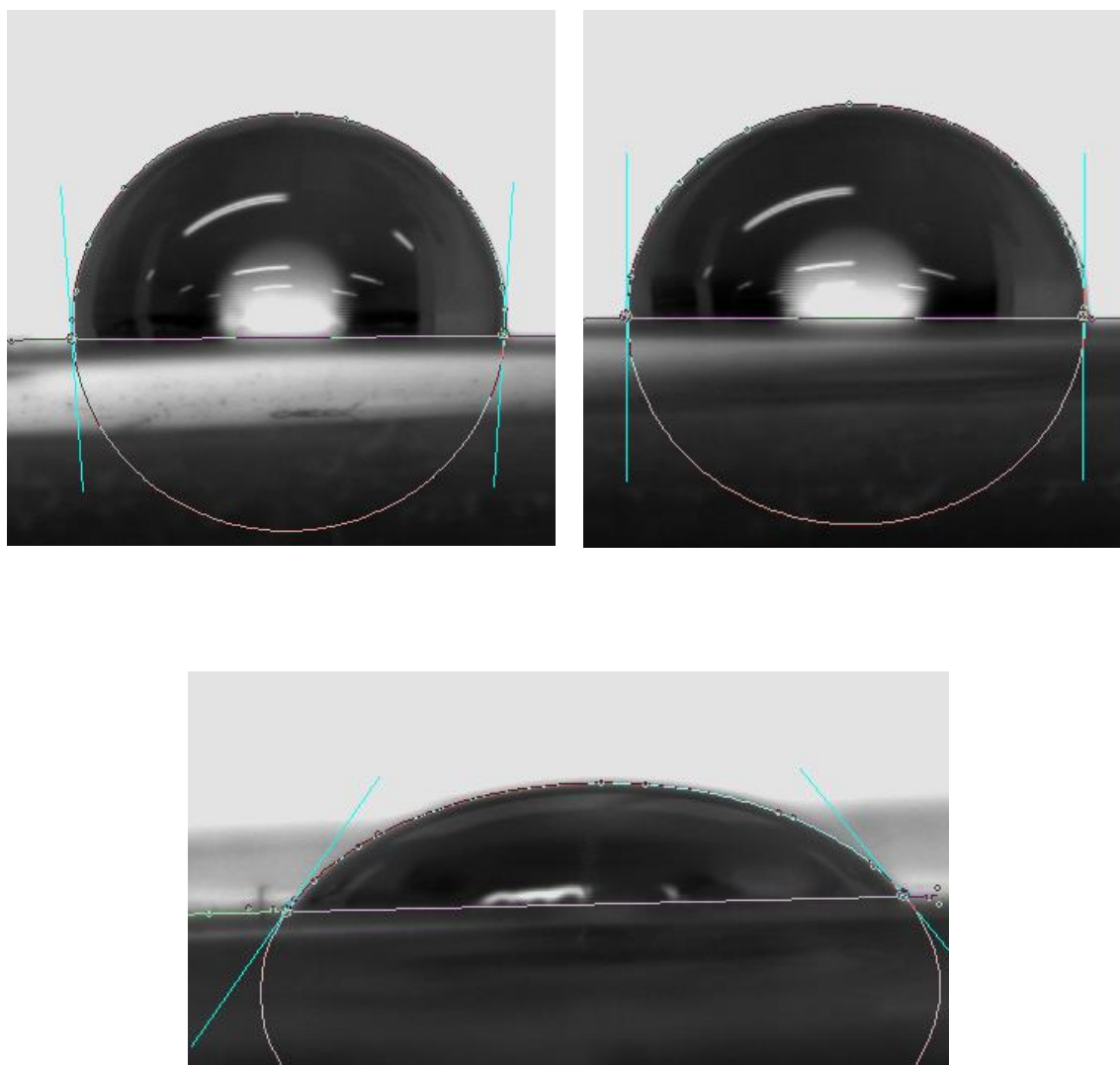


Figura 57.- Ejemplo representativo de las gotas de los tres líquidos empleados sobre LDPE.

Se puede apreciar, que la forma de la gota es diferente en función del líquido empleado. En concreto, como se puede ver en las imágenes, el líquido que peor moja el LDPE es el agua, mostrando el mayor ángulo de contacto. Por otro lado, el que mejor moja es el diiodometano pues presenta el menor ángulo de contacto. Estos resultados son los que cabría esperar teniendo en cuenta las características completamente apolares del polietileno, con un valor de energía superficial de 36.8 mJ/m^2 y una componente polar cero, $\gamma^p = 0 \text{ mJ/m}^2$ [35].

Sang Chul Roh y colaboradores, mediante el método de la gota sobre fibras, determinaron la energía superficial de nanotubos de carbono de pared múltiple y obtuvieron un valor de $\gamma = 42,2 \text{ mJ/m}^2$ con una componente polar de $\gamma^p = 7 \text{ mJ/m}^2$ y una componente dispersiva de $\gamma^d = 32,5 \text{ mJ/m}^2$ [30].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ángulo de contacto, da información de lo mojable que es el material, teniendo así para ángulos mayores, una mayor hidrofobicidad, y por el contrario para ángulos menores una menor hidrofobicidad.

A continuación se presentan las Figuras 58, 59 y 60, en las que se muestra la evolución del ángulo de contacto de uno de los líquidos en relación a cada material.

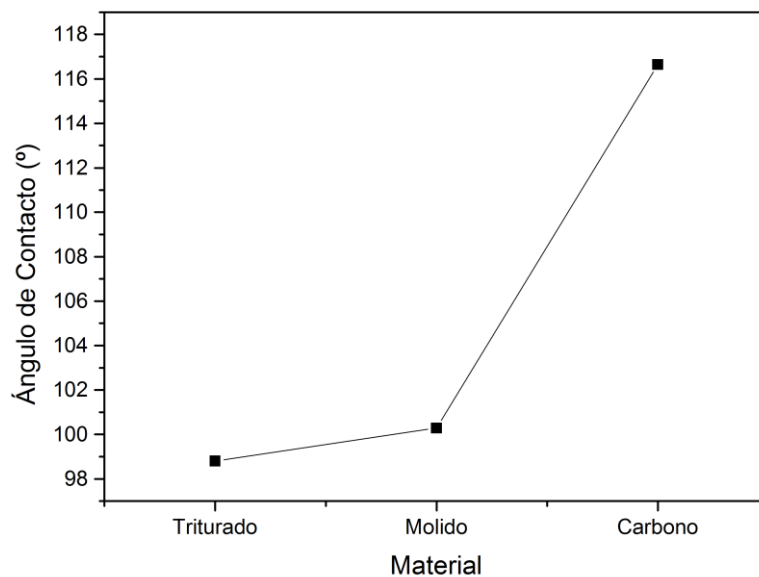


Figura 58.- Evolución del ángulo de contacto del agua en relación a cada material.

Cuando se utiliza agua como líquido de ensayo (Figura 58), se puede observar que al moler, el ángulo de contacto entre el agua y el LDPE aumenta ligeramente de 99 a 100 mientras que al añadir además un 1% en peso de MWCNT, éste aumenta bruscamente hasta 117. Es decir, la superficie se hace más hidrofóbica al realizar molienda y mucho más al añadir MWCNT, al menos en 1% en peso. Podría ser que el aumento del ángulo de contacto entre el polietileno de partida y el que ha sido molido, esté producido por la disminución de la cristalinidad que se consigue con la molienda. Por otra parte, el aumento del ángulo de contacto experimentado, entre el LDPE molido y el LDPE molido con MWCNT, no puede ser debido a la diferencia en la cristalinidad, ya que ésta apenas varía entre ambas muestras. La única diferencia que se aprecia en los demás ensayos llevados a cabo para la caracterización de estos materiales, es que hay una mayor heterogeneidad en los cristales, asociada al efecto nucleante de los nanotubos.

A continuación se muestra el gráfico del ángulo de contacto, utilizando glicerol como líquido:

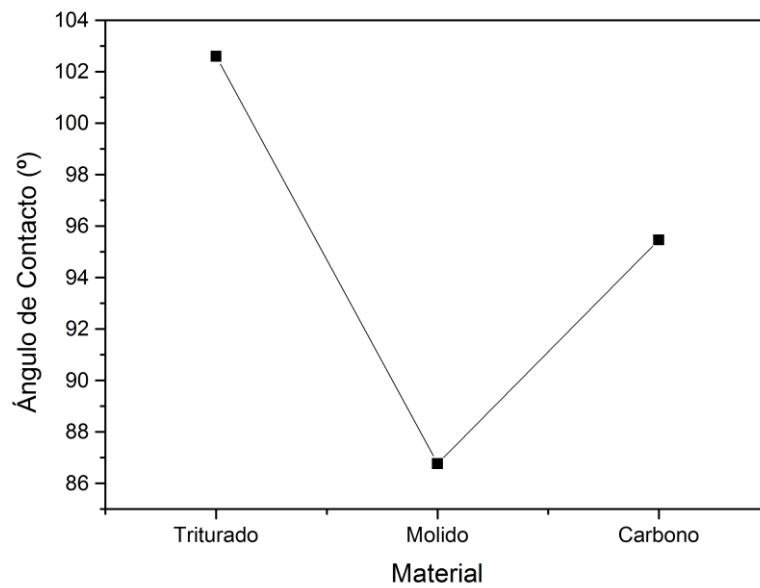


Figura 59.- Evolución del ángulo de contacto del glicerol en relación a cada material.

Cuando se utiliza glicerol como liquido de ensayo (Figura 59), el ángulo de contacto disminuye drásticamente en el LDPE molido y después se recupera al añadir un 1% en peso de MWCNT pero sin llegar al valor que tiene cuando solo está triturado el material.

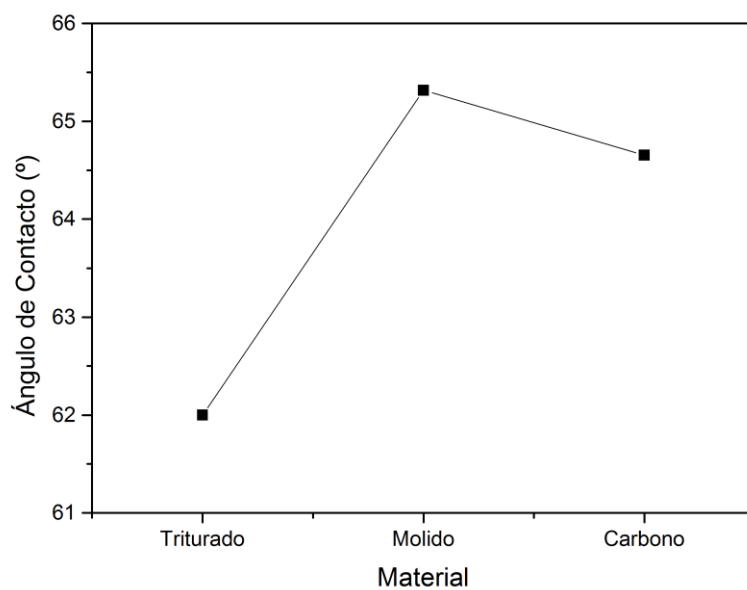


Figura 60.- Evolución del ángulo de contacto del diyodometano en relación a cada material.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se utiliza diyodometano como líquido de ensayo (Figura 60), el ángulo de contacto aumenta considerablemente al realizar una molienda criogénica y decae ligeramente cuando se le incorporan MWCNT, pero sin llegar al valor que posee cuando solo está triturado el material.

Como se comentaba anteriormente, el ángulo de contacto aumenta con la realización de la molienda y se incrementa aún más con el refuerzo de MWCNT. A mayor ángulo de contacto, menor es la mojabilidad, por tanto eso justificaría que las bacterias se adhirieran menos al material molido y menos aún al material compuesto.

En la Tabla 8, se recogen los valores de los ángulos de contacto obtenidos con los distintos líquidos para cada material.

	Ángulo de Contacto [°]		
	Agua	Glicerol	Diyodometano
Triturado	98,8	102,6	62,0
Molido	100,1	86,8	65,3
Carbono	116,7	95,5	64,7

Tabla 8.- Valores de los ángulos de contacto obtenidos con los distintos líquidos para cada material.

A partir de los valores de los ángulos de contacto y utilizando el método de Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK) se pudieron obtener los valores de energía superficial, así como las correspondientes componentes dispersiva y polar (Tabla 9).

	Energía Superficial [mN/m]	Componente Polar [mN/m]	Componente Dispersiva [mN/m]
Triturado	22,1	0,7	21,4
Molido	25,1	0,8	24,3
Carbono	26,0	0,2	25,7

Tabla 9.- Valores de energía superficial y componentes dispersiva y polar de los materiales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor obtenido de energía superficial para el polietileno triturado es bastante menor que los encontrados en bibliografía que suelen estar comprendidos entre 30 y 36 mN/m [30]. Una posible explicación a estos resultados puede ser la existencia de una pequeña capa de agua y otros gases sobre la superficie de los materiales que hace que los valores sean inferiores a los esperados. No obstante, lo más importante es poder utilizar los datos de los tres materiales bajo estudio para compararlos entre sí. Esto último, si se puede hacer, teniendo en cuenta que tanto la preparación de los materiales para el ensayo, como las condiciones de medida fueron exactamente las mismas. Para tener una mejor visualización de los valores de energía de superficie, en función del material estudiado se muestra una representación en la Figura 61.

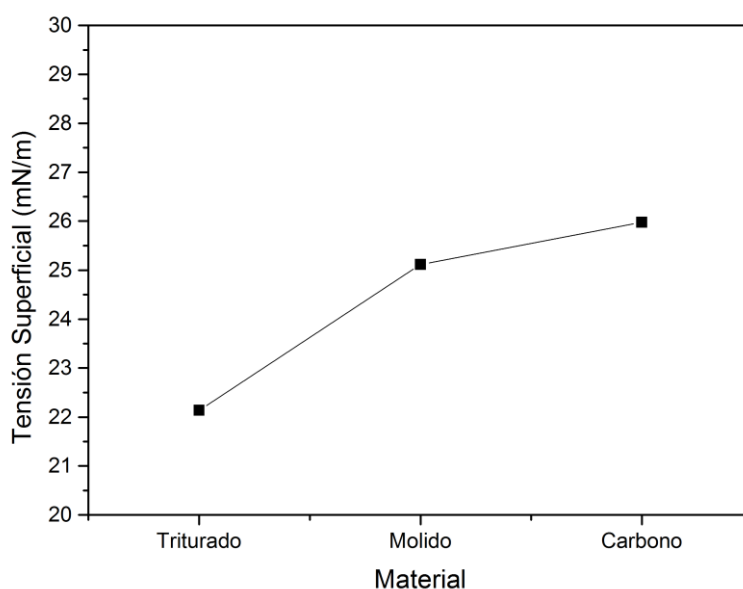


Figura 61.- Valores de energía libre superficial en función del material estudiado.

4.5 Espectrometría Infrarroja (FTIR).

La Figura 62 muestra los espectros infrarrojos en el rango medio de todos los materiales bajo estudio. En todos los casos, se observan las bandas de absorción típicas del polietileno [36].

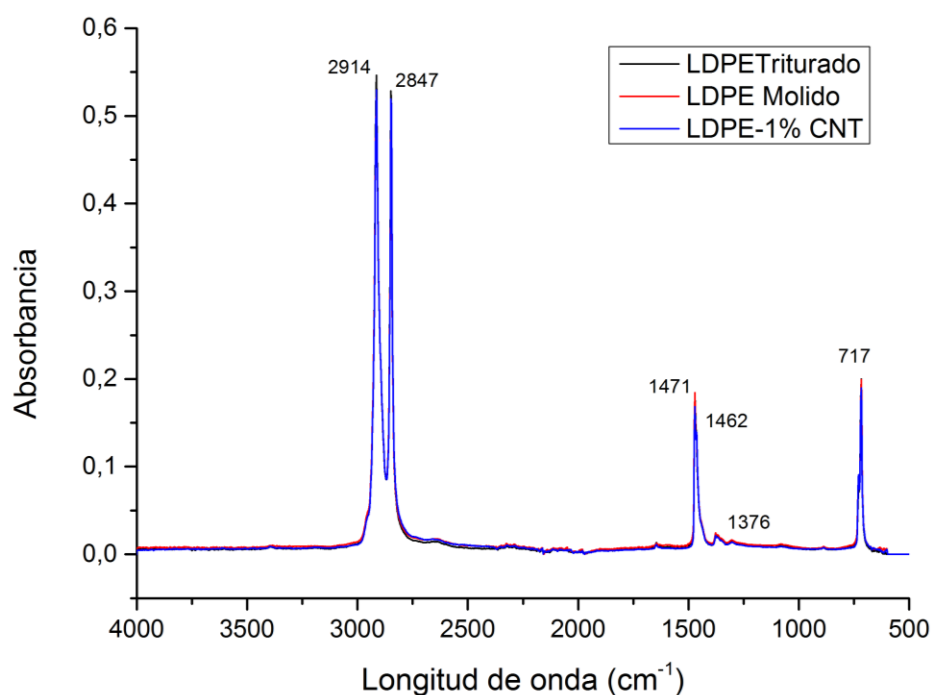


Figura 62.- Espectros infrarrojos de los materiales bajo estudio.

- 2914 cm⁻¹ banda asignada a tensión antisimétrica del grupo metileno, CH₂.
- 2847 cm⁻¹ banda asignada a tensión simétrica del grupo CH₂.
- 1471,4 – 1463 cm⁻¹ banda asignada al modo de flexión del grupo CH₂.
- 727 cm⁻¹ banda asignada al modo de balanceo del grupo CH₂.
- 717,60 cm⁻¹ γ-CH₂.

No se aprecian cambios significativos en la forma de las bandas características entre los materiales en estudio.

Parece que los picos asociados a PE cristalino en las muestras molidas, poseen menor absorbancia relativa lo que sería indicativo de menor cantidad de cristales para esa muestra algo que está totalmente de acuerdo con los resultados de DSC

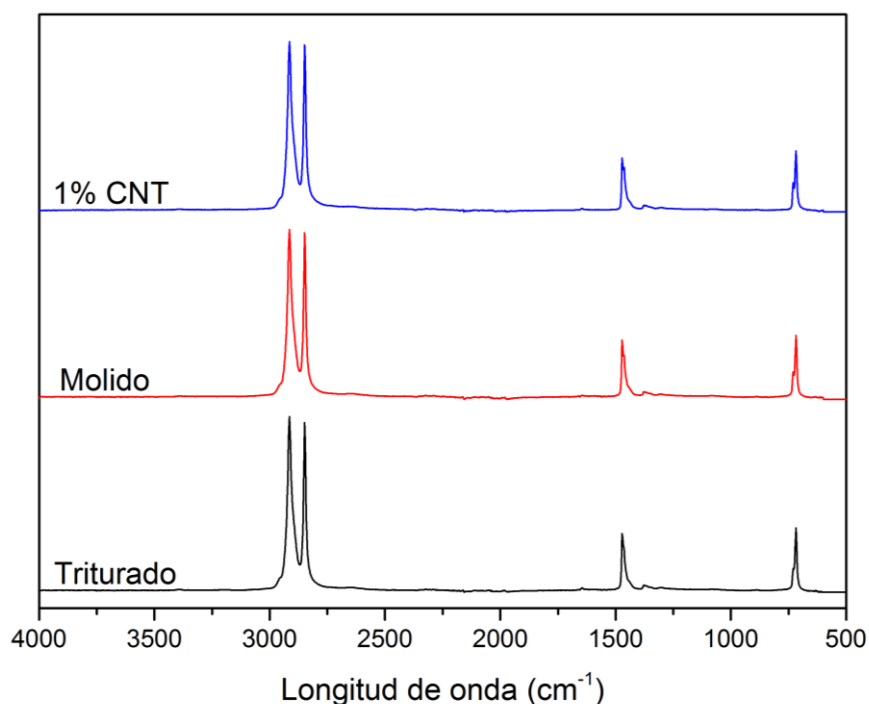


Figura 63.- Espectros infrarrojos de los materiales bajo estudio, de manera separada.

No se aprecian desplazamientos en los picos primarios ni secundarios, en ninguno de los tres materiales (Figura 63). Esto indica, que no se producen reacciones entre los elementos que componen el material.

4.6 Análisis bacteriológico.

De los tres procedimientos de cultivo, que se detallan en este trabajo, se comentaran los resultados obtenidos exclusivamente en el tercero, ya que como se ha expuesto anteriormente, es el que proporciona un nº de colonias óptimo para estudiar el efecto antibacteriano de los materiales.

Según se explica en la parte experimental, en el apartado 3.3.6.2, en el proceso de cultivo se realizan diluciones seriadas del contenido de bacterias que se ha obtenido de cada material. Y se plaquean 10 µL de cada dilución en un cuadrante de una placa y se deja incubar durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se pueden observar las colonias que a continuación se muestran en las Figuras 64, 65 y 66.

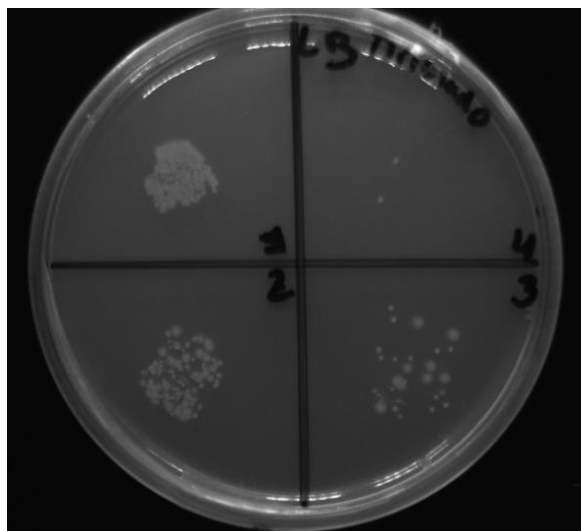


Figura 64.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material de referencia LDPE triturado.

En el polietileno triturado, que es el que se considera como material de referencia, se puede apreciar que existe gran cantidad de bacterias (Figura 64). En el primer cuadrante donde se han plaqueado directamente las bacterias que se han adherido al material, ni siquiera se pueden contar, incluso en la siguiente dilución seriada, tampoco es posible el conteo. Es en el tercer y cuarto cuadrante donde ya es posible contarlas y se obtienen 26 y 2 colonias, respectivamente.

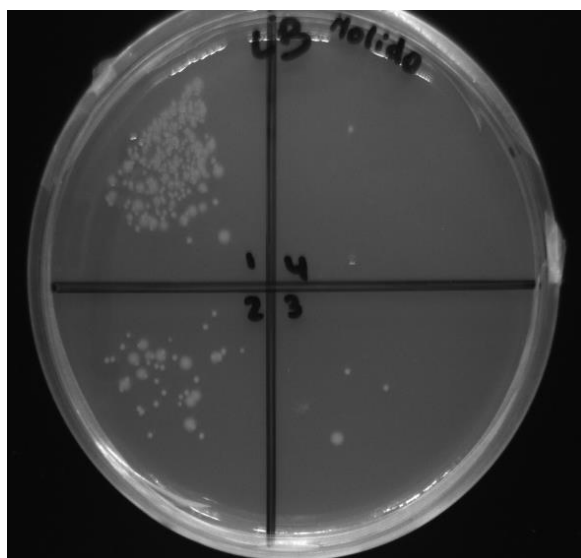


Figura 65.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material de referencia LDPE molido.

En el polietileno que ha sido molido en condiciones criogénicas, se observa que se ha reducido el número de bacterias (Figura 65). En el primer cuadrante, donde se ha plaqueado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

directamente las bacterias que se han adherido al material, de nuevo no se pueden contar, sin embargo, en el resto de cuadrantes, en este caso sí que pueden ser contar, hallándose 35, 4 y 2 en el segundo, tercer y cuarto cuadrante respectivamente.

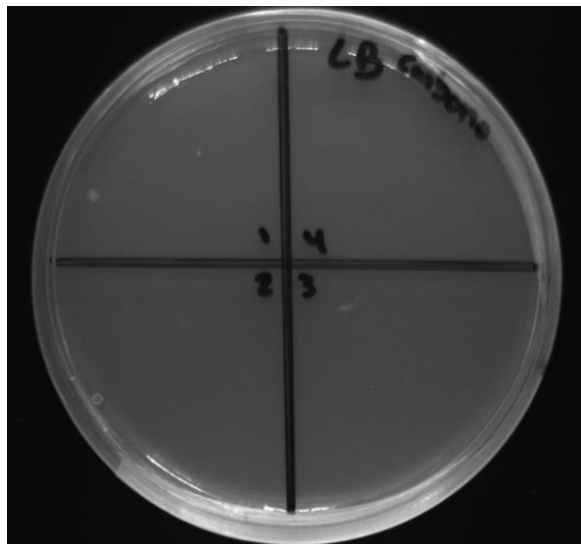


Figura 66.- Cultivo y conteo de bacterias procedentes del material LDPE molido.

En el último caso, el polietileno se ha molido en condiciones criogénicas para realizar una mezcla con 1% del peso de MWCNT (Figura 66). Como se puede ver, apenas hay colonias, sólo en el primer cuadrante se observan dos y en el segundo se observa una. Por tanto el ensayo indica que este último material, es el que tiene mayor carácter antibacteriano, de los que se están estudiando.

Después de realizar el conteo de las colonias que aparecen en cada cuadrante, es necesario calcular el número de bacterias que se han pegado a cada material. Como se han realizado diluciones seriadas y cada una tiene un factor de dilución diferente, es necesario multiplicar el número de colonias encontradas por el factor de dilución utilizado, de modo que se empleara la siguiente fórmula (30), para calcular el número real de bacterias.

$$UFC = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} * (\text{factor de dilución})^{-1}}{\text{mL de muestra sembrada}} \quad (30)$$

Realizando el cálculo, se obtienen los valores que se indican en la Tabla 10.

Número de bacterias				
	1 ^{er} Cuadrante	2 ^o Cuadrante	3 ^{er} Cuadrante	4 ^o Cuadrante
LDPE triturado	-	-	$2,60 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$
LDPE molido	-	$3,50 \times 10^6$	4×10^6	$2,00 \times 10^7$
LDPE + 1% CNT	$2,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	0	0

Tabla 10.- Número de bacterias totales por cuadrantes en cultivo sobre agar-agar procedentes de los distintos materiales bajo estudio.

Como se ha indicado anteriormente, se han hecho varias diluciones para poder hacer el conteo de bacterias sin que haya demasiadas como en el primer cuadrante, y sin que haya tan pocas que se cometa mucho error al comparar, como es el caso del cuarto cuadrante. En este caso el cuadrante que permite comparar el número de bacterias de cada material, de la manera más óptima es el tercero, por lo que se representan los valores obtenidos de los tres materiales en ese cuadrante, para ver la evolución de los datos (Figura 67).

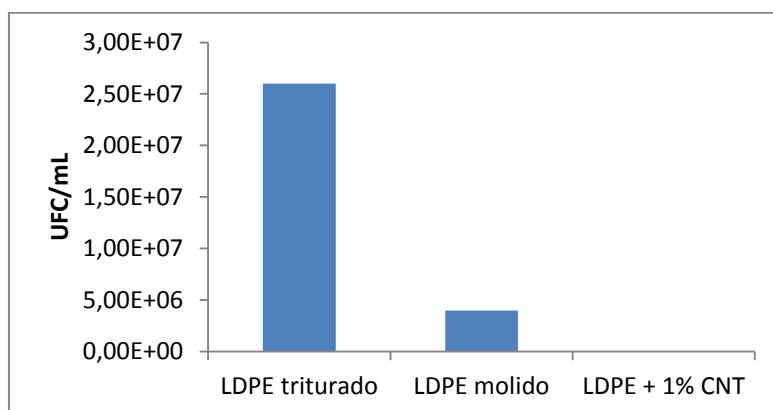


Figura 67.- Gráfico UFC/ml según material.

En la Figura 67, se puede ver que al procesar el LDPE por molienda criogénica, éste adquiere propiedades antibacterianas, al menos en relación al LDPE de partida. Si además de realizarle un molido, se le introducen nanotubos de carbono como material de refuerzo, ese carácter antibacteriano aumenta. Este efecto puede ser debido a que como se ha estudiado anteriormente, la mojabilidad del polietileno disminuye con la molienda, y se reduce aún más con el refuerzo de nanotubos, este resultado justificaría que las bacterias al estar constituidas en su mayoría por agua, disminuyeran su adhesión al material y por tanto aumentarían las

propiedades antibacterianas del mismo. No obstante, parece que la reducción de la mojabilidad en los materiales molidos, proviene del cambio en la fracción cristalina que se produce al realizar en ellos, una molienda criogénica. Así mismo, cuando se introducen nanotubos en el proceso de molienda, se observa una disminución mayor de la mojabilidad, probablemente inducida por la propia presencia de los nanotubos.

4.7 Microscopio electrónico de barrido (SEM).

El microscopio electrónico de barrido, también conocido como SEM, va a ser utilizado para observar los materiales que están siendo estudiados, además de para inspeccionar el desarrollo de los biofilms. Por un lado, permite ver si los biofilms se desarrollan en mayor o menor cuantía y posibilita realizar observaciones detalladas sobre la forma de las propias bacterias, lo cual podría dar pistas de los efectos que el material pudiera causar a dichas bacterias.

Este microscopio utiliza la señal procedente de electrones secundarios y retrodispersados, para mostrar la morfología de la superficie de estudio. En este caso, como se ha explicado anteriormente, sobre cada material se ha realizado un biofilm, y con el microscopio electrónico de barrido, se pretende observar las diferencias en el comportamiento de las bacterias frente a los distintos materiales y valorar si alguno de ellos tiene un comportamiento antibacteriano.

En las Figuras 68, 69 y 70, se pueden observar tres imágenes, cada una de ellas, correspondiente a un material de estudio. Las tres fotos han sido tomadas mediante SEM con electrones secundarios a 40 aumentos y con un voltaje de 10 KV.

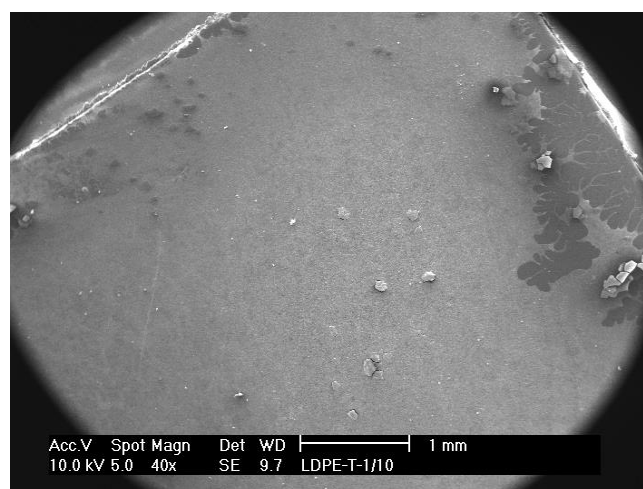


Figura 68.- LDPE Triturado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fotografía de la Figura 68, se observa que casi todo el material está cubierto por un biofilm de bacterias, solo en la zona de la derecha, es donde se puede apreciar una pequeña zona de un tono gris más oscuro que indica que está despoblado. Pero en general se puede decir, que las bacterias se adhieren con facilidad al material creando un biofilm poblado y muy homogéneo.

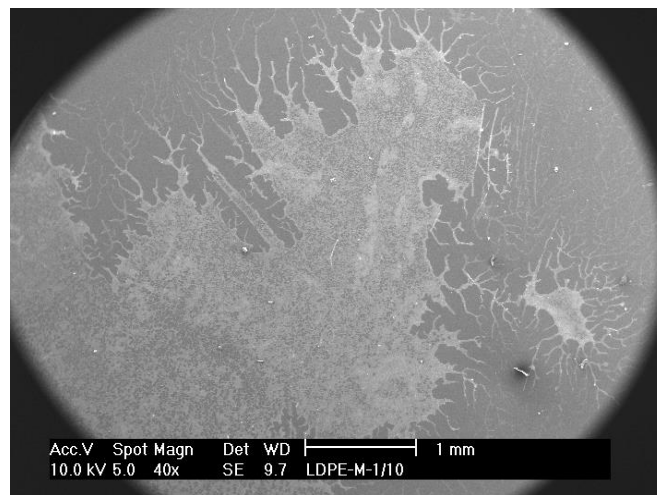


Figura 69.- LDPE Molido.

En la Figura 69, se puede ver que el biofilm generado sobre el LDPE molido no es tan homogéneo como el anterior. Se observan más zonas despobladas de bacterias y la parte poblada tiene ramificaciones. Por lo que parece que las bacterias se adhieren con más dificultad al LDPE cuando ha sido sometido a un proceso de molienda criogénica.

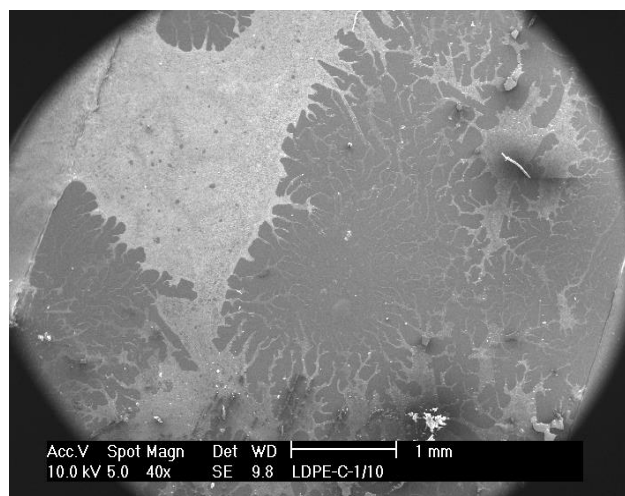


Figura 70.- LDPE-1% MWCNT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 70, se puede apreciar que hay una región bastante grande de material que está despoblada de bacterias, y en la zona donde hay bacterias, la distribución de las mismas es muy ramificada, por lo que en este material la densidad de bacterias en la superficie es bastante menor que en los dos anteriores. Este resultado está completamente de acuerdo con los obtenidos en el conteo de colonias y bacterias respectivamente, realizado en el apartado anterior. Por tanto, se deduce que la adhesión de las bacterias a este material es inferior a la de los materiales anteriores.

De la observación de las imágenes anteriores, se puede concluir, que la realización de un proceso de molienda criogénica al LDPE, le proporciona ciertas propiedades antibacterianas, y si además de ese mecanizado se introduce como material de relleno MWCNT (1% en peso, en este caso) en la matriz de LDPE, estas propiedades antibacterianas se incrementan.

Después de observar el comportamiento de los biofilms frente a los distintos materiales, comparando de manera cualitativa, la densidad de bacterias que se adhieren, se procede a incrementar los aumentos con los que se observan los biofilms; con el propósito, en este caso de ver la morfología de las bacterias.

Las tres fotos han sido tomadas mediante SEM con electrones retrodispersados a 8000 aumentos y con un voltaje de 20 KV.

A continuación, se analizan estas imágenes, Figuras 71, 72 y 73, que han sido obtenidas mediante SEM pero a mayores aumentos y utilizando la señal procedente de los electrones retrodispersados, pues además de poder observar más detalles morfológicos se puede tener información composicional sobre lo observado. Un mayor brillo en las imágenes indica mayor número de electrones retrodispersados que llegan al detector, lo que indicaría la aparición en dicha región de elementos de mayor número atómico.

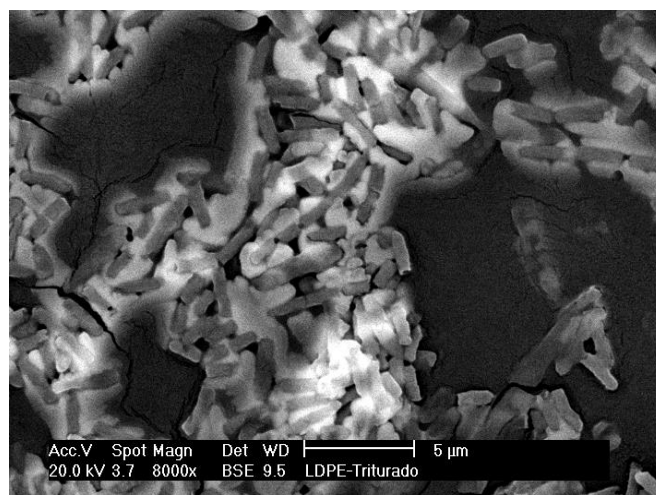


Figura 71.- LDPE Triturado.

En la Figura 71, se observan con más detalle las bacterias del biofilm generado sobre la superficie de LDPE triturado. En general, las bacterias poseen una forma redondeada en los extremos. Y alrededor de ellas, se puede ver una película más brillante por lo que debe poseer una composición más rica en elementos más pesados. En concreto dicha zona brillante podría ser el medio del que cogen los nutrientes. Se pueden ver unas bacterias que son más alargadas, que otras, esto sólo es debido al grado de bipartición en el que se encuentren (ya que estas se reproducen por fisión binaria).

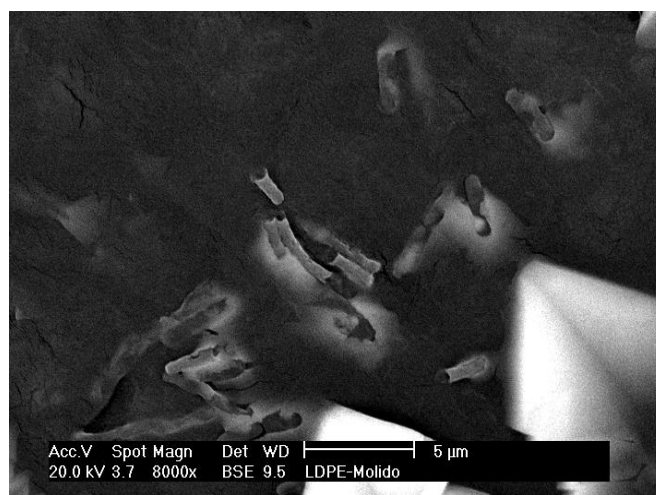


Figura 72.- LDPE Molido.

En la Figura 72, se pueden observar las bacterias del biofilm generado sobre la superficie de LDPE molido. En este caso pierden esa forma redondeada que tenían en los extremos en el material anterior. Y la película que las rodea, se ha reducido considerablemente. La

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

disminución de la adhesión de materia extracelular y con ella, la de los sustratos que sirven de alimento a las bacterias, podría ser la causa de que la proliferación bacteriana sea menor.

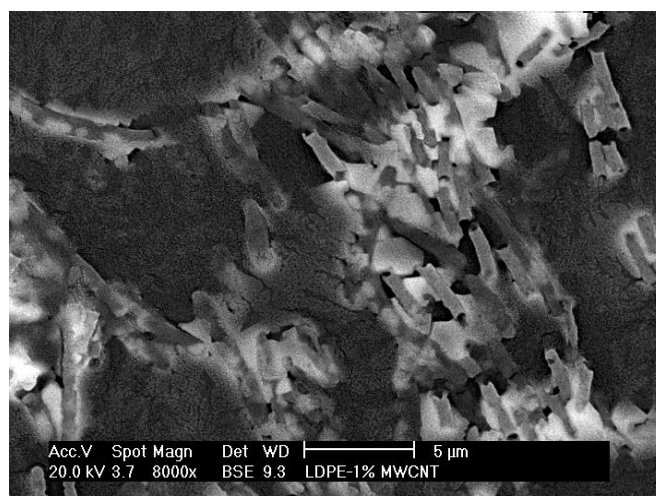


Figura 73.- LDPE-1% MWCNT.

En la Figura 73 se muestran las bacterias asociadas al biofilm generado sobre un sustrato de LDPE-1% MWCNT. En este caso se puede ver que la morfología de las bacterias es similar a las encontradas en el LDPE molido. Parece que las bacterias en este caso están colocadas según una dirección preferente, esto es, se presenta más ordenadas que en los casos anteriores. Esto simplemente puede ser debido a mayor economía de espacio pues las bacterias poseen menos espacio donde adherirse de forma adecuada. Tampoco se observa materia extracelular lo que estaría de acuerdo con lo comentado en el caso del LDPE molido.

Finalmente, de la observación de todas las imágenes del microscopio, se puede concluir que tanto la realización de un proceso de molienda, como la introducción de un refuerzo de MWCNT disminuyen la capacidad de adhesión al material de las bacterias y también del medio en el que viven, por tanto se ve aumentado el efecto antibacteriano, a través de estas dos técnicas.

5. CONCLUSIONES.

Después de haber realizado una molienda criogénica y de haber incorporado nanotubos de carbono a una matriz de polietileno, se observa que se mejoran las características del polímero.

En los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de los distintos materiales, se aprecian ligeras variaciones en algunas de sus propiedades.

Como indican los datos obtenidos en el ensayo de tracción, la acción de nanotubos de carbono mejora las propiedades mecánicas del polietileno, aumentando ligeramente la tensión de rotura, el límite elástico, el módulo de Young y con ello la rigidez del material gracias al efecto reforzante de los nanotubos. Esto es conveniente, si lo que se busca es un material más consistente. Por otro lado, si interesa que el polímero soporte una tensión máxima mayor que la del polietileno sin tratar, se le deberá someter exclusivamente a una molienda criogénica.

En cuanto a las propiedades térmicas de los materiales, no existen variaciones significativas con los procesos de molienda y adición de nanotubos. Solamente se observa que los nanotubos producen un efecto nucleante en la formación de cristales. Por otro lado, la molienda criogénica disminuye ligeramente la entalpía de los materiales frente a la del polietileno triturado, debido posiblemente a la reducción de la cristalinidad.

En el ensayo termogravimétrico no se aprecian diferencias entre los tres materiales estudiados, por lo que se concluye que la degradación térmica es similar entre ellos. Esto indica, que no existen cambios estructurales debidos a procesos de oxidación o rotura de enlaces en los materiales.

Tampoco se aprecian cambios significativos en la estructura interna, según muestra la espectrometría infrarroja, tan solo se observa una pequeña reducción de la absorbancia en los materiales molidos, que indica una disminución de la cristalinidad, fenómeno que también se ha observado en el ensayo de calorimetría.

En el estudio de mojabilidad se observa que el ángulo de contacto entre el material y el agua, aumenta con la realización de la molienda y se incrementa aún más con el refuerzo de nanotubos de carbono. Lo mismo ocurre con los valores de la energía superficial. La consecuencia de que estos valores aumenten, es que se consigue un material más hidrofóbico.

CONCLUSIONES

En el ensayo de cultivo, se observa un número menor de colonias de bacterias, cuando al polietileno se le realiza un proceso de molienda criogénica y aparecen menos colonias aún, cuando al polímero molido se le añaden nanotubos de carbono. Estos resultados fueron ratificados con el análisis de imagen mediante microscopía electrónica de barrido.

Como conclusión final, se deduce que tanto la realización de una molienda criogénica sobre el polietileno de baja densidad, como la adición de nanotubos de carbono a una matriz de este polímero, consiguen una mejora de las cualidades intrínsecas del polietileno y además le proporcionan propiedades antibacterianas.

6. TRABAJOS FUTUROS.

A la vista de los resultados obtenidos, después de haber realizado este trabajo fin de grado, se pueden abrir diferentes líneas de investigación relacionadas con la búsqueda de materiales con propiedades antibacterianas.

Se propone realizar un estudio más amplio en el que se varíe el porcentaje de nanotubos de carbono que se añaden al polietileno, pudiendo analizar así, cómo evoluciona el poder antibacteriano según se va modificando este porcentaje, consiguiendo encontrar de esta forma, la cantidad óptima de nanotubos que se debe añadir al polímero.

También sería interesante, utilizar otro tipo de nanopartículas, para estudiar otros posibles aditivos que confieran propiedades antibacterianas al polietileno y determinar si estas son más o menos intensas.

Por otro lado, esta investigación se podría extender a otros polímeros, cuyas aplicaciones exijan un carácter antibacteriano, e incluso se podría trasladar este estudio a la industria metalúrgica, para materiales que requieran esta propiedad.

Otra propuesta sería revisar el proceso de realización de la molienda criogénica, investigando si es posible la reducción del tiempo de inmersión de las vasijas en nitrógeno líquido, consiguiendo así una disminución del coste y del tiempo en el proceso de producción del material.

7. PRESUPUESTO.

7.1 Presupuesto para ensayo de cultivo.

1-TRYPTONA: 10 GRAMOS/20 PLACAS= 0.151 € POR PLACA

T9410-1KG Disponible para ser enviado el 18.03.15 - 303.50€

2-AGAR: 15 GRAMOS/20 PLACAS= 0.073 € POR PLACA

10572775 - 500GR AGAR

Marca: FISHER BIOREAGENTS

Embalaje: 500 GR

Cantidad Precio por ítem

Código producto inicial : W5374B 1 49,02€

Código fabricante: BP1423-500 500 GR

CAS: 9002-18-0

3-EXTRACTO DE LEVADURAS: 5 GRAMOS/20 PLACAS= 0.017 POR PLACA

15159323 - 1KG Yeast extract

Cantidad Precio por ítem

Marca: ACROS ORGANICS

1 66,60€

Embalaje: 1 KG

Código fabricante: 451120010

PRESUPUESTO

4-PLACAS: 0,016€ por placa

PDIP-10E-500	96,6	12,6	13,9	con 3 vientos, estéril	500	79,73	0,160
--------------	------	------	------	------------------------	-----	-------	-------

TOTAL GASTO POR PLACA: 0.25€ / placa.

5-PERSONAL TÉCNICO: CADA EXPERIMENTO UN DÍA DE TRABAJO

Sueldo mensual: 1600 € / 22 días laborables = **72.72 €** brutos / día.

TOTAL: 73 €/ EXPERIMENTO

Se realizaron 3 experimentos 73€ X 3 = 219 €

7.2 Presupuesto de los materiales empleados.

<u>Nanotubos de carbono, (MWCNT)</u>	ENVASE	PRECIO/ENVASE
Empresa suministradora Sigma-Aldrich	100g/bote	590,00€/ bote
0,035 gramos/ film	precio/film= 4,84€/film	
X 1 film	Gasto debido a MWCNT =4, 84 €.	

<u>Polietileno de Baja Densidad</u>	ENVASE	PRECIO/ENVASE
Empresa suministradora Sigma-Aldrich	250g/bote	29,20€/ bote
3,5 gramos/ film	precio/film=0,41€/film	
X 3 films	Gasto debido a LDPE = 1,23 €.	

<u>Kapton film (304 X 200 X 0.75 mm)</u>	LOTE	PRECIO/LOTE
Empresa suministradora Sigma-Aldrich	5 láminas/ lote	69,42€/ lote
1 lámina/ film	precio/film=13,88€/film	
X 3 films	Gasto debido a KAPTON = 41,65 €.	

TOTAL 47,72 € / MATERIALES

7.3 Presupuesto de equipos utilizados.

Equipo: Molino MF 10 Basic Microfine

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 2 horas

Total: 20 €

Equipo: Molino mezclador criogénico MM400 de la marca comercial RESTCH

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 8 horas.

Total: 80€

Equipo: Prensa de platos calientes de la marca Fontijne Presses TPB374

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 4 horas

Total: 40 €

Equipo: Máquina Universal de ensayos de tracción de la serie Shimadzu Autograph

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 4 horas

Total: 40 €

Equipo: Mettler Toledo 822e bajo atmósfera de nitrógeno

Precio / hora: 20 €/ hora

Nº de horas: 3 horas

Total: 60 €

Equipo: Microscopio PHILLIPS xl30

PRESUPUESTO

Precio / hora: 40 €/ hora

Nº de horas: 6 horas

Total: 240 €

Equipo: OCA 15 suministrado por KRÜSS GmbH

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 3 horas

Total: 30 €

Equipo: Espectrómetro Nicolette Avatar ATR-FTIR

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 3 horas

Total: 30 €

Equipo: Termobalanza modelo TGA-SDTA 851 MEttrler Toledo

Precio / hora: 10 €/ hora

Nº de horas: 3 horas

Total: 30 €

Se han utilizado los equipos durante 36 horas, y se necesita un técnico que realice el ensayo y controle el equipo.

Coste del técnico/ hora: 9€ / hora.

Tiempo: 30 horas.

Coste total del técnico: 324 €.

TOTAL: 894 €.

7.4 Presupuesto del trabajo de análisis de ingeniero junior.

Horas totales de trabajo desempeñadas por ingeniero junior: 300 horas

Honorario por horas para ingeniero junior: 12 €/ hora

TOTAL: 3600 €.

7.5 Presupuesto total del trabajo de investigación.

PRESUPUESTO PARA ENSAYO DE CULTIVO TOTAL:	219,00 €
PRESUPUESTO MATERIALES EMPLEADOS:	47,72 €
PRESUPUESTO EQUIPO UTILIZADO :	894,00 €
PRESUPUESTO ANALISIS INGENIERO JUNIOR:	3600,00 €
TOTAL	4760,72€

8. REFERENCIAS.

1. J. C. Hannon, J. Kerry, M. Cruz-Romero, M. Morris y E. Cummins, "Advances and challenges for the use of engineered nanoparticles in food contact materials". (2015)
2. Plastic Sorting with Chemical Imaging Systems
<http://www.chemical-imaging.com/plastic-sorting.html>
3. Plastic Industry Trends, Market Research & Statistics
<http://www.reportlinker.com/ci02375/Plastic.html>
4. Growth Projected in additives and barrier coatings for plastic packaging
<http://www.foodproductiondaily.com/Markets/Growth-projected-in-additives-and-barrier-coatings-for-plastic-packaging>
5. M. L. Andrade, L. I. López y A. Sáenz, "Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas". (2012)
6. Documento informativo sobre producto antibacteriano Healthcare Disinfection Suite
http://www.ipcleaning.net/data/att/istituzionale/productnews/att_622012154456.pdf
7. P. Appendini y J H. Hotchkiss, "Review of antimicrobial food packaging".(2002)
8. Y. Martínez-Tenorio y A. López-Malo, "Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos." (2011)
9. Cioffi N. et al. Chem. Mater., 17, 5255–62 (2005).
10. Jeyaraman R. et al. Materials Letters, 71, 114–116 (2012).
11. Jayesh P.R. et al. Acta Biomaterialia, 5, 1-9 (2008).
12. Monteiro D.R. et al. Int. J. Antimicrob. Agents, 34, 103–10 (2009).
13. D. Olmos, J. González-Benito et al. Mater. Lett., 127, 1-3 (2014).
14. J.M.C. Robertson et al. J. Photochem. Photobiol., A175, 51–56, (2005).
15. A.G. Rincon et al. Appl. Catal. B44, 263–284, (2003).
16. K. Sunada et al. Environ. Sci. Technol., 32, 726-728 (1998).

REFERENCIAS

17. Walid Bahloula et al. *Mater. Chem. Phys.*, 134, 399–404 (2012).
18. Hong SI, Krochta JM. *J. Food Eng.*, 77, 739-45 (2006).
19. D. Olmos, J. González-Benito et al. *Polymer*, 50, 1732-1742 (2009).
20. D. Olmos, F. Martinez, J. González-Benito, *Eur. Polym. J.* 47, 1495-1502 (2011).
21. D. Olmos, J. González-Benito, *Polym. Comp.* 33, 2009-2021 (2012).
22. J. Gonzalez-Benito, G. Gonzalez-Gaitano et al. *Polym. Test.*, 32, 1342-1349 (2013).
23. Espí, E. et al. *J. Plastic Film & Sheeting*, 22, 85-102 (2006).
24. Scopa, A. et al. *Scientia Horticulturae* 116, 98-103 (2008). Abrusci, C., Pablos, J.L., Marin, I., Espi, E., Corrales, T., Catalina, F. *J. App. Polym. Sci.* 126, 1664-1675 (2012).
25. Costa R. et al. *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine*, 24, 395-403 (2012).
26. M. J. Rivas, J. Román y M. L. Cosme, “Informe de vigilancia tecnológica; Aplicaciones actuales y futuras de los nanotubos de carbono.”
27. M. L. Guel, L. I. López y A. S. Sáenz, “Nanotubos de carbono: Funcionalización y aplicaciones biológicas”.(2012)
28. S. Jeong, D. Kim y J. Seo, “Preparation and antimicrobial properties of LDPE composite films melt-blended with polymerized urushiol powders (YPUOH) for packaging applications.” (2015)
29. S. E. Salih, A. F. Hamood y A. H. Abd alsalam, “Comparison of the Characteristics of LDPE - PP and HDPE - PP Polymer Blends” (2013)
30. Young, T. (1805). «An Essay on the Cohesion of Fluids». *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 95: 65–87.doi:10.1098/rstl.1805.0005].
31. Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK) method
<http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/owens-wendt-rabel-and-kaelble-owrk-method/>
32. Ström, G., Fredriksson, M., Stenius, P., Radoev, B., “Kinetics of steady-state wetting.” (1990).

REFERENCIAS

33. I. P. S. Thomé, V. S. Dagostin, R. Rileti, C. T. Pich, H. G. Riella, E. Angioletto y M. A. Fiori, "Bactericidal Low Density Polyethylene (LDPE) urinary catheters: Microbiological characterization and effectiveness." (2011)
34. William D. Callister, Jr, "Ciencia e ingeniería de los materiales".
35. Sang Chul Roh, Eun Yub Choi, Yeon Sik Choi, C. K. Kim. Characterization of the surface energies of functionalized multiwalled carbon nanotubes and their interfacial adhesion energies with various polymers. Polymer 55 (2014) 1527-1536.
36. D. Olmos, G. González-Gaditano y J. González-Benito," Effect of silica nanofiller on the structure, dynamics and thermostability of LDPE in LDPE/silica nanocomposites".